ÍSLENSK útgáfa

EES-viðbætir

við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins

ISSN 1022-9337

Nr. 15

30. árgangur

23.2.2023

I EES-STOFNANIR

1. Sameiginlega EES-nefndin

2023/EES/15/01 Reglugerð ráðsins (EB) nr. 440/2008 frá 30. maí 2008 þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)) (Texti sem varðar EES) 1

II EFTA-STOFNANIR

1. Fastanefnd EFTA-ríkjanna

2. Eftirlitsstofnun EFTA

3. EFTA-dómstóllinn

III ESB-STOFNANIR

1. Framkvæmdastjórnin

EES-STOFNANIR

SAMEIGINLEGA EES-NEFNDIN

REGLUGERÐ RÁÐSINS (EB) nr. 440/2008 **2023/EES/15/01**

frá 30. maí 2008

þar sem mælt er fyrir um prófunaraðferðir samkvæmt reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH))

(Texti sem varðar EES) (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af reglugerð Evrópuþingsins og ráðsins (EB) nr. 1907/2006 frá 18. desember 2006 um skráningu, mat, leyfisveitingu og takmarkanir, að því er varðar efni (efnareglurnar (REACH)), um stofnun Efnastofnunar Evrópu, um breytingu á tilskipun 1999/45/EB og um niðurfellingu á reglugerð ráðsins (EBE) nr. 793/93 og reglugerð framkvæmdastjórnarinnar (EB) nr. 1488/94, sem og tilskipun ráðsins 76/769/EBE og tilskipunum framkvæmdastjórnarinnar 91/155/EBE, 93/67/EBE, 93/105/EB og 2000/21/EB ([1]), einkum 3. mgr. 13. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

1) Samkvæmt reglugerð (EB) nr. 1907/2006 skal samþykkja prófunaraðferðir innan Bandalagsins til prófana á efnum ef þörf er á slíkum prófunum til að afla upplýsinga um eðliseiginleika efna.

2) Í V. viðauka við tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna ([2]) var mælt fyrir um aðferðir til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif efna og efnablandna. V. viðauki við tilskipun 67/548/EBE var felldur brott með tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2006/121/EB frá og með 1. júní 2008.

3) Prófunaraðferðirnar í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE skulu felldar inn í þessa reglugerð.

4) Þessi reglugerð útilokar ekki notkun annarra prófunaraðferða, að því tilskildu að notkun þeirra sé í samræmi við 3. mgr. 13. gr. reglugerðar 1907/2006.

5) Við hönnun prófunaraðferða skal taka fullt tillit til meginreglnanna um staðgönguaðferðir eða aðferðir sem munu fækka dýrunum, sem eru notuð við prófanir, og milda þjáningar þeirra, einkum þegar viðeigandi fullgiltar aðferðir verða tiltækar sem geta komið í staðinn fyrir prófanir á dýrum, dregið úr þeim eða mildað þær.

6) Ákvæði þessarar reglugerðar eru í samræmi við álit nefndarinnar sem var komið á fót skv. 133. gr. reglugerðar (EB) nr. 1907/2006,

SAMÞYKKT REGLUGERÐ ÞESSA:

1. gr.

Prófunaraðferðirnar, sem skal beitt að því er varðar reglugerð 1907/2006/EB, eru settar fram í viðaukanum við þessa reglugerð.

2. gr.

Framkvæmdastjórnin skal endurskoða prófunaraðferðirnar í þessari reglugerð, eftir því sem við á, í þeim tilgangi að taka upp aðferðir sem geta komið í staðinn fyrir prófanir á hryggdýrum, dregið úr þeim eða mildað þær.

(*) Þessi ESB-gerð birtist í Stjtíð. ESB L 142, 31.5.2008, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 12/2012 frá 10. febrúar 2012 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við *Stjórnartíðindi Evrópusambandsins* nr. 34, 21.6.2012, bls. 22.

([1]) Stjtíð. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 1, með leiðréttingum samkvæmt Stjtíð. ESB L 136, 29.5.2007, bls. 3.

([2]) Stjtíð. EB 196, 16.8.1967, bls. 1. Tilskipuninni var síðast breytt með tilskipun Evrópuþingsins og ráðsins 2006/121/EB (Stjtíð. ESB L 396, 30.12.2006, bls. 850, með leiðréttingum samkvæmt Stjtíð. ESB L 136, 29.5.2007, bls. 281).

3. gr.

Líta ber á allar tilvísanir í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE sem tilvísun í þessa reglugerð.

4. gr.

Reglugerð þessi öðlast gildi daginn eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópusambandsins*.

Hún kemur til framkvæmda frá og með 1. júní 2008.

Gjört í Brussel 30. maí 2008.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Stavros DIMAS

framkvæmdastjóri.

VIÐAUKI

A-HLUTI: AÐFERÐIR TIL AÐ ÁKVARÐA EÐLISEFNAFRÆÐILEGA EIGINLEIKA

EFNISYFIRLIT

A.1.	BRÆÐSLUMARK/FROSTMARK	4
A.2.	SUÐUMARK	14
A.3.	HLUTFALLSLEGUR EÐLISMASSI	21
A.4.	GUFUÞRÝSTINGUR	26
A.5.	YFIRBORÐSSPENNA	50
A.6.	VATNSLEYSNI	57
A.8.	DEILISTUÐULL	67
A.9.	BLOSSAMARK	80
A.10.	ELDFIMI (FÖST EFNI)	82
A.11.	ELDFIMI (LOFTTEGUNDIR)	85
A.12.	ELDFIMI (Í SNERTINGU VIÐ VATN)	87
A.13.	LOFTKVEIKJANDI EIGINLEIKAR FASTRA EFNA OG VÖKVA	91
A.14.	SPRENGIFIMI	93
A.15.	SJÁLFSÍKVEIKJUHITASTIG (VÖKVAR OG GASTEGUNDIR)	104
A.16.	HLUTFALLSLEGT SJÁLFSÍKVIKNUNARHITASTIG (FÖST EFNI)	106
A.17.	OXUNAREIGINLEIKAR (FÖST EFNI)	109
A.18.	MEÐALSAMEINDAÞYNGD OG SAMEINDAÞYNGDARDREIFING FJÖLLIÐNA	114
A.19.	INNIHALD SAMEINDA MEÐ LITLA SAMEINDAÞYNGD Í FJÖLLIÐUM	123
A.20.	LEYSANLEIKI/ÚTDRAGANLEIKI FJÖLLIÐNA Í VATNI	131
A.21.	OXUNAREIGINLEIKAR (VÖKVAR)	135

A.1. **BRÆÐSLUMARK/FROSTMARK**

1. **AÐFERÐ**

Flestar aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á viðmiðunarreglu OECD (Efnahags- og framfarastofnunarinnar) um prófanir (1. heimild). Grundvallarreglurnar eru settar fram í 2. og 3. heimild.

1.1. INNGANGUR

Nota skal aðferðirnar og tækin, sem er lýst hér, til þess að ákvarða bræðslumark efna, hvert sem hreinleikastig þeirra er.

Val á aðferð er háð eðli efnisins sem prófa skal. Það ræður því úrslitum hvort auðvelt, erfitt eða ógerlegt er að dyfta (e. *pulverise*) efnið.

Fyrir sum efni hentar betur að ákvarða frostmark eða storknunarmark og hafa staðlar fyrir slíka ákvörðun einnig verið teknir með í þessari aðferð.

Þegar ekki er hægt með góðu móti að mæla neinn framangreindra þátta vegna sérstakra eiginleika efnisins kann að henta að ákvarða rennslismarkið.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Bræðslumark er skilgreint sem hitastigið þegar fasabreyting úr föstu ástandi í fljótandi ástand við loftþrýsting á sér stað og þetta hitastig er hið sama og frostmarkið við kjöraðstæður.

Þar eð fasabreyting margra efna á sér stað á tilteknu hitasviði er henni oft lýst sem bræðslumarksbili.

Umreikningur eininga (K í °C)

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

t : hitastig á selsíus, gráða á selsíus (°C)

T : varmafræðilegt hitastig, kelvin (K)

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

Nokkur kvörðunarefni eru tilgreind í heimildunum (4. heimild).

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Hitastigið (hitasviðið) við fasabreytingu úr föstu ástandi í fljótandi eða úr fljótandi ástandi í fast er ákvarðað. Í reynd gerist þetta þannig að sýnishorn af prófunarefninu er hitað eða kælt við loftþrýsting og ákvarðað við hvaða hitastig bráðnun eða storknun hefst og hvenær henni lýkur. Lýst er fimm tegundum aðferða, þ.e. hárpípuaðferð, hitaborðsaðferðum, frostmarksákvörðunum, aðferðum við vermigreiningu og ákvörðun á rennslismarki (sem var þróuð fyrir jarðolíur).

Í ákveðnum tilvikum getur verið hentugt að mæla frostmarkið í stað bræðslumarksins.

1.4.1. **Hárpípuaðferð**

1.4.1.1. *Bræðslumarksbúnaður með vökvabaði*

Lítið magn af fínmöluðu efninu er sett í hárpípu og þjappað rækilega. Pípan er hituð ásamt hitamæli og hitahækkunin er stillt á minna en 1 K/mín. meðan eiginleg bráðnun stendur yfir. Hitastig við upphaf og lok bráðnunar er ákvarðað.

1.4.1.2. *Bræðslumarksbúnaður með málmblokk*

Eins og lýst er í 1.4.1.1 nema að því leyti að hárpípu og hitamæli er komið fyrir í upphitaðri málmblokk og hægt er að fylgjast með þeim í gegnum göt á blokkinni.

1.4.1.3. *Greining með ljósnema*

Sýnið í hárpípunni er hitað sjálfvirkt í málmhólki. Ljósgeisla er beint í gegnum efnið, um gat á hólknum, á nákvæmlega kvarðaðan ljósnema. Ljóseiginleikar flestra efna breytast við bræðslu úr ógagnsæi í gagnsæi. Styrkur ljóssins, sem nær til ljósnemans, eykst og sendir stöðvunarmerki til stafræns álestrartækis sem sýnir hitastigið á platínuviðnámshitamæli sem staðsettur er í hitahólfinu. Þessi aðferð hentar ekki fyrir sum sterklituð efni.

1.4.2. **Hitaborð**

1.4.2.1. *Kofler-hitabekkur*

Kofler-hitabekkurinn er gerður úr tveimur málmstykkjum með mismunandi varmaleiðni sem eru hituð með rafmagni, stafurinn er útbúinn þannig að hitastigullinn er því sem næst línulegur í lengdarstefnu hans. Hitastigið á hitabekknum getur verið á bilinu 283–573 K og er ákvarðað með sérstöku hitaálestrartæki með sleða með vísi og kvarða sem er hannað fyrir þennan tiltekna bekk. Til að ákvarða bræðslumarkið er þunnt lag af efninu látið beint á yfirborð hitabekksins. Eftir nokkrar sekúndur myndast skörp skil á milli fljótandi og fasta fasans. Hitastigið á þessum skilum er lesið með því að færa bendilinn svo að hann hvíli á skilunum.

1.4.2.2. *Bræðslusmásjá*

Ýmsar hitaborðssmásjár eru notaðar til ákvarða bræðslumark með mjög litlu efnismagni. Í flestum hitaborðum er hitastigið mælt með næmum snertispennunema en stundum eru kvikasilfursmælar notaðir. Í dæmigerðu tæki til bræðslumarksákvörðunar með smásjá og hitaborði er hitahólf sem í er málmplata sem sýnisgler með sýninu er sett á. Í miðju málmplötunnar er gat sem hleypir í gegn ljósi frá lýsingarspegli smásjárinnar. Þegar tækið er í notkun er hólfinu lokað með glerplötu til að loft komist ekki að sýnissvæðinu.

Hitun sýnisins er stjórnað með renniviðnámi. Fyrir mjög nákvæmar mælingar á ljósmisátta (e. *optically anisotropic*) efnum má nota skautað ljós.

1.4.2.3. *Bjúgflataraðferð (e. Meniscus method)*

Þessi aðferð er aðeins notuð fyrir pólýamíð.

Hitastigið við tilfærslu á sílíkonolíubjúgfleti, sem er lokaður á milli hitaborðsins og þekjuglers sem hvílir á pólýamíðprófunarsýninu, er ákvarðað sjónrænt.

1.4.3. **Aðferð til ákvörðunar á frostmarki**

Sýnið er sett í sérstakt tilraunaglas og komið fyrir í tæki til ákvörðunar á frostmarkinu. Hrært er varlega og stöðugt í sýninu meðan það er að kólna og hitastigið mælt með hæfilegu millibili. Þegar hitastigið helst stöðugt nokkrar mælingar í röð er það hitastig (leiðrétt fyrir skekkju hitamælis) skráð sem frostmarkið.

Komist skal hjá undirkælingu með því að viðhalda jafnvægi milli fasts og fljótandi fasa.

1.4.4. **Vermigreining**

1.4.4.1 *Mismunarvermigreining (e. differential thermal analysis (DTA))*

Með þessari tækni er munurinn á hitastigi efnisins og viðmiðunarefnis skráður sem fall af hitastigi á meðan efnið og viðmiðunarefnið fá sömu stýrðu hitameðferðina. Þegar fasabreyting verður á sýninu sem felur í sér breytingu á vermi kemur sú breyting fram sem innvermið (bráðnun) eða útvermið (storknun) frávik frá grunnlínunni á hitaritinu.

1.4.4.2 *Mismunarvarmamæling með skönnun (e. differential scanning calorimetry (DSC))*

Með þessari tækni er munurinn á orkuupptöku efnisins og viðmiðunarefnis skráður sem fall af hitastigi á meðan efnið og viðmiðunarefnið fá sömu stýrðu hitameðferðina. Þessi orka er sú orka sem þarf til að hitamunurinn milli efnisins og viðmiðunarefnisins verði núll. Þegar fasabreyting verður á sýninu sem felur í sér breytingu á vermi kemur sú breyting fram sem innvermið (bráðnun) eða útvermið (storknun) frávik frá grunnlínunni á hitastreymisritinu.

1.4.5. **Rennslismark**

Þessi aðferð var þróuð til notkunar með jarðolíum og hentar til notkunar með olíukenndum efnum með lágt bræðslumark.

Eftir forhitun er sýnið kælt á tilteknum hraða og rennsliseiginleikar skoðaðir með 3 K millibili. Lægsta hitastigið, þar sem hreyfing er greinanleg á efninu, er skráð sem rennslismark.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Notkunarsvið og nákvæmni hinna ýmsu aðferða, sem eru notaðar til að ákvarða bræðslumark eða bræðslumarksbil, eru sýnd í eftirfarandi töflu:

TAFLA: NOTKUNARSVIÐ AÐFERÐANNA

A. **Hárpípuaðferðir**

Mæliaðferð	Efni sem hægt er að dyfta	Efni sem ekki er auðvelt að dyfta	Hitasvið	Áætluð nákvæmni (1)	Gildandi staðlar
Bræðslumarksbúnaður með vökvabaði	já	aðeins fáein	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Bræðslumarksbúnaður með málmblokk	já	aðeins fáein	293 til >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E).
Greining með ljósnema	já	nokkur með hjálp sérstaks búnaðar	253–573 K	±0,5 K	|

(1) Háð gerð tækis og hreinleika efnisins.

B. **Aðferðir með hitaborðum og frystingu**

Mæliaðferð	Efni sem hægt er að dyfta	Efni sem ekki er auðvelt að dyfta	Hitasvið	Áætluð nákvæmni (2)	Gildandi staðlar
Kofler-hitabekkur	já	nei	283 til >573 K	± 1K	ANSI/ASTM D 3451-76
Bræðslusmásjá	já	aðeins fáein	273 til >573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Bjúgflataraðferð	nei	aðeins fyrir pólýamíð	293 til >573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E).
Frostmark	já	já	223–573 K	±0,5 K	t.d. BS 4695

(1) Háð gerð tækis og hreinleika efnisins.

C. **Vermigreining**

Mæliaðferð	Efni sem hægt er að dyfta	Efni sem ekki er auðvelt að dyfta	Hitasvið	Áætluð nákvæmni (3)	Gildandi staðlar
Mismunarvermigreining	já	já	173–1273 K	að 600 K ± 0,5 K að 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Mismunarvarmamæling með skönnun	já	já	173–1273 K	að 600 K ± 0,5 K að 1273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Háð gerð tækis og hreinleika efnisins

D. **Rennslismark**

Mæliaðferð	Efni sem hægt er að dyfta	Efni sem ekki er auðvelt að dyfta	Hitasvið	Áætluð nákvæmni (4)	Gildandi staðlar
Rennslismark	fyrir jarðolíur og olíukennd efni	fyrir jarðolíur og olíukennd efni	223–323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Háð gerð tækis og hreinleika efnisins

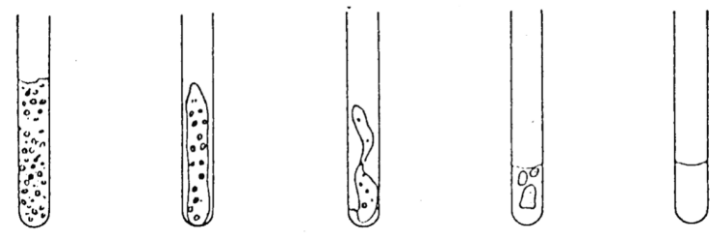
1.6. LÝSING Á AÐFERÐUNUM

Verkferlum við nær allar prófunaraðferðirnar hefur verið lýst í alþjóðlegum stöðlum og landsstöðlum (sjá 1. viðbæti).

1.6.1. **Aðferðir með hárpípu**

Þegar fíndyft efni eru hituð hægt fara þau venjulega í gegnum þau stig bráðnunar sem sýnd eru á mynd 1.

Mynd 1



Stig A (Upphaf bráðnunar): fíngerðir smádropar dreifast jafnt á innra borð hárpípunnar.

Stig B Rými myndast milli sýnis og innra borðs vegna þess að sýnið rýrnar við að bráðna.

Stig C Sýnið hefur rýrnað, byrjar að falla saman og verður fljótandi.

Stig D Heill bjúgflötur myndast við yfirborð vökvans en umtalsvert magn sýnisins er áfram í föstu formi.

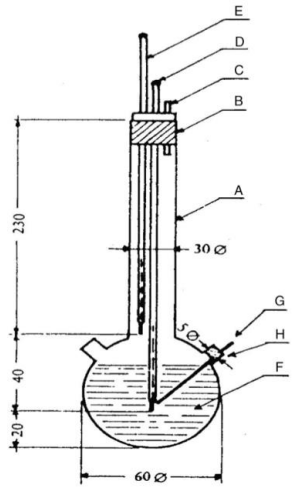
Stig E (Lokastig bráðnunar): engar fastar agnir finnast.

Við ákvörðun á bræðslumarki er hitastig skráð við upphaf og lokastig bráðnunar.

1.6.1.1. *Bræðslumarksbúnaður með vökvabaði*

Á mynd 2 er sýnd ein gerð staðlaðs bræðslumarksbúnaðar úr gleri (JIS K 0064) og eru öll mál í millimetrum.

Mynd 2



A: Mæliílát
B: Tappi
C: Loftop
D: Hitamælir
E: Aukahitamælir
F: Baðvökvi
G: Hárpípa úr gleri, 80–100 mm á lengd, innra þvermál 1,0 ± 0,2 mm, veggþykkt 0,2–0,3 mm
H: Hliðarrör

Baðvökvi:

Velja skal hentugan vökva. Valið á vökva fer eftir bræðslumarkinu sem ákvarða skal, t.d. fljótandi paraffín fyrir bræðslumark sem er ekki hærra en 473 K, sílíkonolía fyrir bræðslumark sem er ekki hærra en 573 K.

Ef bræðslumarkið er yfir 523 K má nota blöndu sem samanstendur af þremur hlutum af brennisteinssýru og tveimur hlutum af kalíumsúlfati (massahlutfall). Gera skal viðeigandi varúðarráðstafanir ef blanda eins og þessi er notuð.

Hitamælir:

Aðeins skal nota hitamæla sem uppfylla kröfur eftirfarandi staðla eða annarra sambærilegra:

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

Verkferli:

Þurrt efnið er fíndyft í mortéli og sett í hárpípuna, sem er lokuð í annan endann, þannig að hæð fyllingarinnar sé um 3 mm eftir að henni hefur verið þjappað vel saman. Til að sýnið þjappist jafnt skal láta hárpípuna falla lóðrétt úr um 700 mm hæð í gegnum glerpípu niður á úrgler.

Fyllt hárpípan er sett í baðið þannig að miðhluti kvikasilfurskúlu hitamælisins snerti hárpípuna þar sem sýnið er. Venjulega er hárpípunni komið fyrir í búnaðinum þegar hiti baðvökvans er um 10 K undir bræðslumarkinu.

Baðvökvinn er hitaður svo að hitahækkunin sé um 3 K/mín. Hræra skal í vökvanum. Við u.þ.b. 10 K undir væntanlegu bræðslumarki er hraði hitahækkunarinnar stilltur á hámark 1 K/mín.

Útreikningur:

Bræðslumarkið er reiknað út á eftirfarandi hátt:

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

þar sem:

T = leiðrétt bræðslumark í K
T_D = hitastigsaflestur af hitamæli D í K
T_E = hitastigsaflestur af hitamæli E í K
n = fjöldi kvarðastrika á kvikasilfurssúlu útistandandi hluta hitamælis D.

1.6.1.2. *Bræðslumarksbúnaður með málmblokk*

Búnaður:

Hann samanstendur af:

— sívalri málmblokk þar sem efri hlutinn er holur og myndar hólf (sjá mynd 3),

— málmtappa með tveimur eða fleiri götum þar sem hægt er að setja pípur í málmblokkina,

— hitunarkerfi fyrir málmblokkina, sem getur til dæmis verið rafmagnsviðnám inni í blokkinni,

— renniviðnámi til að stjórna orkuinntaki, ef rafhitun er notuð,

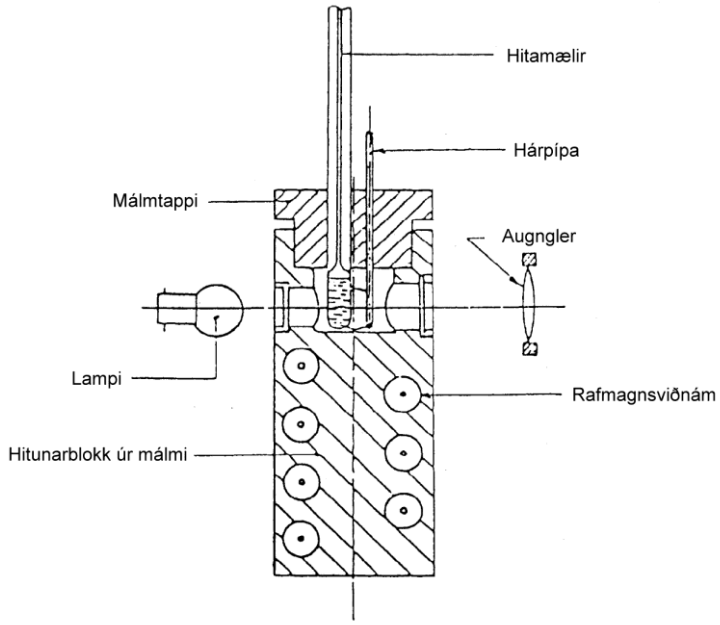
— fjórum gluggum úr hitaþolnu gleri á hliðarveggjum hólfsins og skulu þeir standast á og vera hornréttir hver á annan. Fyrir framan einn af þessum gluggum er augngleri komið fyrir svo að unnt sé að fylgjast með hárpípunni í gegnum það. Hinir þrír gluggarnir eru notaðir til að lýsa hólfið upp að innan með lömpum;

— hárpípu úr hitaþolnu gleri sem er lokuð í annan endann (sjá 1.6.1.1).

Hitamælir:

Sjá staðla sem getið er í 1.6.1.1. Einnig má nota rafhitamælibúnað með sambærilegri nákvæmni.

Mynd 3



1.6.1.3. *Greining með ljósnema*

Búnaður og verkferli

Búnaðurinn samanstendur af málmhólfi með sjálfvirku hitunarkerfi. Þrjár hárpípur eru fylltar skv. 1.6.1.1 og settar í ofninn.

Nokkrir, misjafnlega hraðir, línulegir hitahækkunarferlar eru fyrir hendi til að kvarða búnaðinn og viðeigandi hitahækkun er stillt með rafmagni á forvalinn, fastan og línulegan hraða. Ritar sýna raunverulegan ofnhita og hitastig efnisins í hárpípunum.

1.6.2. **Hitaborð**

1.6.2.1. *Kofler-hitabekkur*

Sjá viðbæti.

1.6.2.2. *Bræðslusmásjá*

Sjá viðbæti.

1.6.2.3. *Bjúgflataraðferð (pólýamíð)*

Sjá viðbæti.

Upphitunarhraðinn við bræðslumarkið skal vera minni en 1 K/mín.

1.6.3. **Aðferðir til að ákvarða frostmark**

Sjá viðbæti.

1.6.4. **Vermigreining**

1.6.4.1. *Mismunarvermigreining*

Sjá viðbæti.

1.6.4.2. *Mismunarvarmamæling með skönnun*

Sjá viðbæti.

1.6.5. **Ákvörðun á rennslismarki**

Sjá viðbæti.

2. **GÖGN**

Leiðrétting á hitamæli er nauðsynleg í sumum tilvikum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða aðferð er notuð,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi) og forhreinsun, ef hún hefur farið fram,

— áætluð nákvæmni.

Meðaltal minnst tveggja mælinga, sem eru innan marka áætlaðrar nákvæmni (sjá töflur), er skráð sem bræðslumark.

Ef hitamunur við upphaf og lokastig bráðnunar er innan nákvæmnismarka aðferðarinnar telst hitastigið við lokastig bráðnunar vera bræðslumarkið, að öðrum kosti eru bæði hitastigin skráð.

Ef efnið brotnar niður eða þurrgufar áður en bræðslumarkinu er náð skal skrá við hvaða hitastig þessa varð vart.

Tilgreina skal allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

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

Viðbætir

Frekari tæknilegar upplýsingar er t.d. að finna í eftirfarandi stöðlum.

1.	**Hárpípuaðferðir**	
1.1.	Bræðslumarksbúnaður með vökvabaði	
	ASTM E 324-69	Standard test method for relative initial and final melting points and the melting range of organic chemicals
	BS 4634	Method for the determination of melting point and/or melting range
	DIN 53181	Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfarehn
	JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products
1.2.	Bræðslumarksbúnaður með málmblokk	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
	ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of "melting point"
2.	**Hitaborð**	
2.1.	Kofler-hitabekkur	
	ANSI/ASTM D 3451-76	Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings
2.2.	Bræðslusmásjá	
	DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
2.3.	Bjúgflataraðferð (pólýamíð)	
	ISO 1218 (E)	Plastics — polyamides — determination of "melting point"
	ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
	NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du "point de fusion" méthode du ménisque
3.	**Aðferðir til að ákvarða frostmark**	
	BS 4633	Method for the determination of crystallising point
	BS 4695	Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)
	DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
	ISO 2207	Cires de pétrole: détermination de la température de figeage
	DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
	NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
	NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
	ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4.	**Vermigreining**	
4.1.	Mismunarvermigreining	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
4.2.	Mismunarvarmamæling með skönnun	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
5.	**Ákvörðun á rennslismarki**	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils — Determination of pour point

A.2. **SUÐUMARK**

1. **AÐFERÐ**

Flestar aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á viðmiðunarreglu OECD (Efnahags- og framfarastofnunarinnar) um prófanir (1. heimild). Grundvallarreglurnar eru settar fram í 2. og 3. heimild.

1.1. INNGANGUR

Aðferðirnar og tækin, sem er lýst, má nota fyrir vökva og efni með lágt bræðslumark, að því tilskildu að þau verði ekki fyrir efnahvarfi undir suðumarki (t.d.: sjálfsoxun, endurröðun, niðurbroti o.s.frv.). Aðferðirnar má nota á hreina og óhreina vökva.

Áhersla er lögð á aðferðir þar sem notuð er ljósnemagreining og vermigreining þar eð þessar aðferðir gera það kleift að ákvarða bæði bræðslumark og suðumark. Enn fremur er hægt að gera mælingar sjálfvirkt.

„Streymisaðferðin“ (e. *dynamic method*) hefur þann kost að hana má einnig nota til að ákvarða gufuþrýsting og ekki er nauðsynlegt að leiðrétta suðumarkið með tilliti til staðalþrýstings (101,325 kPa) því að staðalþrýstinginn má stilla með þrýstijafnara (e. *manostat*) meðan mæling fer fram.

Athugasemdir:

Áhrif óhreininda á ákvörðun á suðumarki eru að miklu leyti háð eðli óhreinindanna. Ef sýnið inniheldur rokgjörn óhreinindi sem gætu haft áhrif á niðurstöðurnar má hreinsa efnið.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Staðalsuðumark er skilgreint sem hitastigið þar sem gufuþrýstingur vökva er 101,325 kPa.

Ef suðumarkið er ekki mælt við staðalloftþrýsting má lýsa sambandi hitastigs og gufuþrýstings með Clausius-Clapeyron-jöfnunni:

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

þar sem:

p = gufuþrýstingur efnisins í paskölum
ΔH_v = uppgufunarvarmi efnisins í J $mól^{-1}$
R = almenni gasfastinn = 8,314 J $mól^{-1}$ K^{-1}
T = varmafræðilegt hitastig í K

Suðumarkið er tilgreint miðað við umhverfisþrýsting við mælinguna.

Umreikningur

Þrýstingur (einingar: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa.
(einingin bar er enn leyfð en ekki mælt með henni)
133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr
(einingarnar „mm Hg“ og „Torr“ eru ekki leyfðar)
1 atm = staðalloftþyngd = 101325 Pa
(einingin „atm“ er ekki leyfð)

Hitastig (einingar: K)

$t = T – 273,15$

t : hitastig á selsíus, gráða á selsíus (°C)
T : varmafræðilegt hitastig, kelvin (K)

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

Nokkur kvörðunarefni má finna undir aðferðunum sem skráðar eru í viðbætinum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Fimm aðferðanna til að ákvarða suðumark (suðumarksbil) byggjast á mælingum á hita við suðu en tvær á vermigreiningu.

1.4.1. **Ákvörðun með suðumarksmæli (e. *ebulliometer*)**

Suðumarksmælar voru upphaflega þróaðir til að ákvarða sameindaþyngd með hækkun suðumarks en þeir henta einnig til nákvæmra mælinga á suðumarki. Mjög einföldum búnaði er lýst í ASTM D 1120-72 (sjá viðbæti). Vökvinn er hitaður í þessum búnaði við jafnvægisaðstæður við loftþrýsting uns hann sýður.

1.4.2. **Streymisaðferð**

Þessi aðferð byggist á mælingu á endurþéttingarhitastigi gufu með viðeigandi hitamæli í baksvalanum meðan á suðu stendur. Hægt er að breyta þrýstingnum þegar þessari aðferð er beitt.

1.4.3. **Eimingaraðferð til að ákvarða suðumark**

Með þessari aðferð er vökvinn eimaður, endurþéttingarhitastig gufunnar mælt og magn eimaða vökvans ákvarðað.

1.4.4. **Aðferð Siwoloboffs**

Sýni er hitað í sýnisglasi sem er sökkt í vökva í hitabaði. Lokaðri hárpípu með loftbólu neðst er dýft í sýnisglasið.

1.4.5. **Greining með ljósnema**

Í samræmi við meginreglu Siwoloboffs er gerð sjálfvirk mæling með ljósnema á bólunum sem stíga upp.

1.4.6. **Mismunarvermigreining**

Með þessari tækni er munurinn á hitastigi efnisins og viðmiðunarefnis skráður sem fall af hitastigi á meðan efnið og viðmiðunarefnið fá sömu stýrðu hitameðferðina. Þegar fasabreyting verður á sýninu sem felur í sér breytingu á vermi kemur sú breyting fram sem innvermið frávik (suða) frá grunnlínunni á hitaritinu.

1.4.7. **Mismunarvarmamæling með skönnun**

Með þessari tækni er munurinn á orkuupptöku efnisins og viðmiðunarefnis skráður sem fall af hitastigi á meðan efnið og viðmiðunarefnið fá sömu stýrðu hitameðferðina. Þessi orka er sú orka sem þarf til að hitamunurinn milli efnisins og viðmiðunarefnisins verði núll. Þegar fasabreyting verður á sýninu sem felur í sér breytingu á vermi kemur sú breyting fram sem innvermið frávik (suða) frá grunnlínunni á hitastreymisritinu.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Notkunarsvið og nákvæmni hinna ýmsu aðferða, sem eru notaðar til að ákvarða suðumark eða suðumarksbil, eru sýnd í töflu 1.

Tafla 1:

Samanburður á aðferðum

Mæliaðferð	Áætluð nákvæmni	Gildandi staðall
Suðumarksmælir	± 1,4 K (að 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (að 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Streymisaðferð	± 0,5 K (að 600 K) (2)	
Eimingarferli (suðumarksbil)	± 0,5 K (að 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Aðferð Siwoloboffs	± 2 K (að 600 K) (2)	
Greining með ljósnema	± 0,3 K (að 373 K) (2)	
Mismunarvarmamæling	± 0,5 K (að 600 K) ± 2,0 K (að 1273 K)	ASTM E 537-76
Mismunarvarmamæling með skönnun	± 0,5 K (að 600 K) ± 2,0 K (að 1273 K)	ASTM E 537-76

(1) Þessi nákvæmni gildir aðeins fyrir einfalda búnaðinn eins og er t.d. lýst í ASTM D 1120-72, hann má bæta með fullkomnari suðumarksmælum.

(2) Gildir aðeins fyrir hrein efni. Færa skal rök fyrir notkun við aðrar aðstæður.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐUNUM

Verkferlum við sumar prófunaraðferðirnar hefur verið lýst í alþjóðlegum stöðlum og landsstöðlum (sjá viðbæti).

1.6.1. **Suðumarksmælir**

Sjá viðbæti.

1.6.2. **Streymisaðferð**

Sjá prófunaraðferð A.4 fyrir ákvörðun á gufuþrýstingi.

Suðumarkið, sem mælist við 101,325 kPa þrýsting, er skráð.

1.6.3. **Eimingarferli (suðumarksbil)**

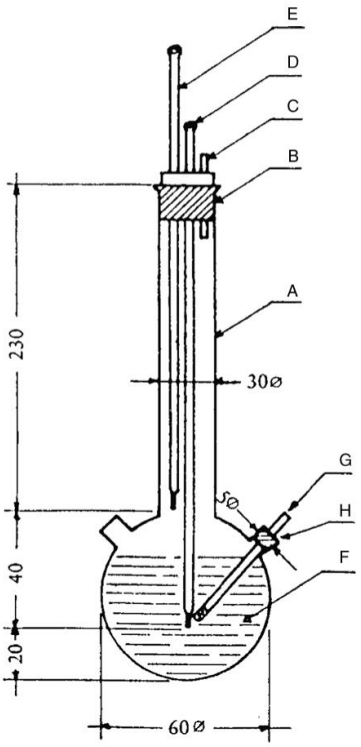
Sjá viðbæti.

1.6.4. **Aðferð Siwoloboffs**

Sýnið er hitað í bræðslumarksbúnaði í sýnisglasi sem er u.þ.b. 5 mm í þvermál (mynd 1).

Mynd 1 sýnir eina gerð af stöðluðum bræðslu- og suðumarksbúnaði (JIS K 0064) (úr gleri, öll mál eru í millimetrum).

Mynd 1

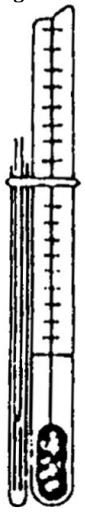


A: Mæliílát
B: Tappi
C: Loftop
D: Hitamælir
E: Aukahitamælir
F: Baðvökvi
G: Sýnisglas, að hámarki 5 mm að ytra þvermáli, sem inniheldur hárpípu, um 100 mm á lengd, innra þvermál um 1 mm og veggþykkt um 0,2–0,3 mm
H: Hliðarrör

Hárpípa (suðuhárpípu (e. *boiling capillary*)), sem er brædd saman u.þ.b. 1 cm fyrir ofan neðri endann, er komið fyrir í sýnisglasinu. Prófunarefninu er bætt í þar til hinn bræddi hluti hárpípunnar er undir yfirborði vökvans. Sýnisglasið með suðuhárpípunni er annaðhvort fest við hitamælinn með gúmmíteygju eða því haldið föstu með hliðarstuðningi (sjá mynd 2).

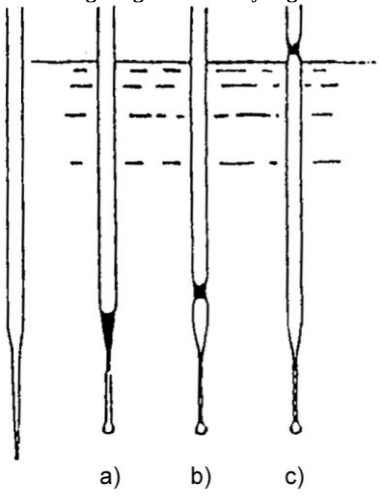
Mynd 2

Meginregla Siwoloboffs



Mynd 3

Meginreglan með breytingum



Baðvökvinn er valinn með tilliti til suðumarks. Við hitastig upp að 573 K má nota sílíkonolíu. Fljótandi paraffín er aðeins hægt að nota upp að 473 K. Baðvökvinn er hitaður þannig að hitahækkunin sé um 3 K/mín. Hræra verður í baðvökvanum. Við um 10 K fyrir neðan væntanlegt suðumark er hægt á hituninni svo að hitahækkunin verði minni en 1 K/mín. Þegar hitinn nálgast suðumarkið fara loftbólur að streyma ört úr suðuhárpípunni.

Þegar loftbólustraumurinn stöðvast við andartakskælingu og vökvi fer skyndilega að stíga í hárpípunni er hitastigi suðumarks náð. Hitamælirinn sýnir þá suðumark efnisins.

Með breyttu meginreglunni (mynd 3) er suðumarkið ákvarðað í bræðslumarkshárpípu. Hún er teygð í mjóan odd, um 2 cm að lengd (a), og svolítið magn af efninu er sogað upp. Opið á mjóa endanum er brætt saman þannig að lítil loftbóla verði eftir við endann. Við hitun í bræðslumarksbúnaðinum (b) þenst bólan út. Suðumarkið samsvarar hitastiginu þegar efnistappinn (e. *substance plug*) nær sömu hæð og yfirborð baðvökvans (c).

1.6.5. **Greining með ljósnema**

Sýnið er hitað í hárpípu inni í hitaðri málmblokk.

Ljósgeisla er beint inn um þar til gerð göt á blokkinni, í gegnum efnið og að nákvæmlega kvörðuðum ljósnema.

Þegar hiti sýnisins hækkar sleppa einstaka loftbólur úr suðuhárpípunni. Þegar suðumarki er náð fjölgar loftbólunum mjög. Þetta veldur breytingu á styrk þess ljóss, sem ljósneminn nemur, og sendir stöðvunarmerki til álestrartækisins sem sýnir hitastigið á platínuviðnámshitamæli sem komið er fyrir í blokkinni.

Þessi aðferð er einkar gagnleg þar eð með henni er unnt að gera ákvarðanir undir stofuhita, allt niður í 253,15 K (– 20 ºC), án nokkurra breytinga á búnaðinum. Aðeins þarf að koma tækinu fyrir í kælibaði.

1.6.6. **Vermigreining**

1.6.6.1. *Mismunarvermigreining*

Sjá viðbæti.

1.6.6.2. *Mismunarvarmamæling með skönnun*

Sjá viðbæti.

2. **GÖGN**

Við lítil frávik frá staðalþrýstingi (að hámarki ± 5 kPa) er suðumarkið leiðrétt að T_n með eftirfarandi tölugildisjöfnu eftir Sidney Young:

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

þar sem:

Δp = (101,325 – p) (takið eftir formerkinu)
P = þrýstingur mældur í kPa
f_T = hlutfallslegar breytingar á suðumarki með þrýstingi, í K/kPa
T = mælt suðumark í K
T_n = suðumark í K, leiðrétt fyrir staðalþrýstingi

Leiðréttingarstuðlarnir fyrir hitastig, f_T, ásamt nálgunarjöfnum fyrir þá, eru gefnir upp fyrir mörg efni í alþjóðlegu stöðlunum og landsstöðlunum sem um getur hér að framan.

Til dæmis eru í aðferðinni samkvæmt DIN 53171 nefndar eftirfarandi nálgunarleiðréttingar fyrir leysa sem eru notaðir í málningu:

Tafla 2:

Stuðlar til leiðréttingar á hitastigi, f_T

Hitastig T (K)	Leiðréttingarstuðull f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37

Hitastig T (K)	Leiðréttingarstuðull f_T (K/kPa)
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða aðferð er notuð,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi) og forhreinsun, ef hún hefur farið fram,

— áætluð nákvæmni.

Meðaltal minnst tveggja mælinga, sem eru innan marka áætlaðrar nákvæmni (sjá töflu 1), er skráð sem suðumarkið.

Skrá skal mæld suðumörk og meðaltal þeirra og gefa upp þrýstinginn, sem mælingarnar voru gerðar við, í kPa. Æskilegt er að þrýstingurinn sé nálægt staðalloftþrýstingi.

Tilgreina skal allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

Viðbætir

Frekari tæknilegar upplýsingar er t.d. að finna í eftirfarandi stöðlum.

1. **Suðumarksmælir**

1.1. Bræðslumarksbúnaður með vökvabaði

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

2. **Eimingarferli (suðumarksbil)**

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

3. **Mismunarvermigreining og mismunarvarmamæling með skönnun**

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

A.3. HLUTFALLSLEGUR EÐLISMASSI

1. **AÐFERÐ**

Aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir (1. heimild). Grundvallarreglurnar eru settar fram í 2. heimild.

1.1. INNGANGUR

Þær aðferðir til ákvörðunar á hlutfallslegum eðlismassa, sem er lýst hér, má nota jafnt fyrir föst efni sem fljótandi, hvert sem hreinleikastig þeirra er. Hinar ýmsu aðferðir sem nota skal eru taldar upp í töflu 1.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Hlutfallslegur eðlismassi (D^{20}_4) fastra efna og vökva er hlutfallið milli massa tiltekins rúmmáls af efninu sem rannsaka á, sem er ákvarðaður við 20 ºC, og massa sama rúmmáls af vatni sem er ákvarðaður við 4 ºC. Hlutfallslegur eðlismassi hefur enga vídd.

Eðlismassi, ρ, efnis er hlutfall af massa þess, m, og rúmmáli, v.

Eðlismassinn, ρ, er gefinn í SI-einingum í kg/m^3.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI (1 og 3. heimild)

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐANNA

Notaðir eru fjórir flokkar aðferða.

1.4.1. **Uppdriftsaðferðir**

1.4.1.1. Flotmælir (fyrir fljótandi efni)

Hægt er að ákvarða eðlismassa nógu nákvæmlega og fljótt með flotmælum þar sem leiða má út eðlismassa vökva með því að lesa af kvarða á mælunum hversu djúpt þeir sökkva.

1.4.1.2. Flotvog (fyrir vökva og föst efni)

Nota má muninn á þyngd prófunarsýnis í lofti og í hentugum vökva (t.d. vatni) til að ákvarða eðlismassa þess.

Þegar um er að ræða föst efni á mældur eðlismassi aðeins við um sýnið sem var notað við ákvörðunina. Til að ákvarða eðlismassa vökva er hlutur með þekktu rúmmáli, v, veginn fyrst í lofti og síðan í vökvanum.

1.4.1.3. Aðferð þar sem hlut er sökkt (fyrir fljótandi efni) (4. heimild)

Með þessari aðferð er eðlismassi vökva ákvarðaður út frá muninum á þeim niðurstöðum sem fást með því að vigta vökvann áður en og eftir að hlut með þekktu rúmmáli hefur verið sökkt í prófunarvökvann.

1.4.2. **Aðferðir með vökvavog**

Nota má vökvavogir af mismunandi lögun og með þekktu rúmmáli fyrir föst efni og vökva. Til þess að reikna út eðlismassann er notaður mismunurinn á þyngd vökvavogarinnar, fullrar og tómrar, og þekkt rúmmál hennar.

1.4.3. **Vökvavog með loftsamanburði** (fyrir föst efni)

Hægt er að mæla eðlismassa fasts efnis, í hvaða formi sem er, við stofuhita með vökvavog með gassamanburði. Rúmmál efnisins er mælt í lofti eða óhvarfgjarnri lofttegund í sívölu íláti sem hefur breytilegt, kvarðað rúmmál. Til að reikna út eðlismassa er gerð ein massamæling eftir að niðurstaða er fengin úr rúmmálsmælingunni.

1.4.4. Eðlismassasveiflumælir (5.–7. heimild)

Hægt er að mæla eðlismassa vökva með eðlismassasveiflumæli. Aflrænn sveiflugjafi, sem er U-laga rör, er látinn sveiflast á eigintíðni sinni en hún ræðst af massa hans. Þegar sýni er bætt við breytist eigintíðni sveiflugjafans. Búnaðinn þarf að kvarða með tveimur vökvum með þekktum eðlismassa. Æskilegt er að þessi efni séu valin þannig að eðlismassi þeirra spanni allt sviðið sem mæla skal.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Notkunarsvið hinna ýmsu aðferða, sem eru notaðar til að ákvarða hlutfallslegan eðlismassa, eru tilgreind í töflunni.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐUNUM

Í viðbætinum eru gefin dæmi um staðla þar sem frekari tæknilegar upplýsingar er að finna.

Prófanirnar skulu gerðar við 20 ºC og gera skal minnst tvær mælingar.

2. **GÖGN**

Sjá staðla.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða aðferð er notuð,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi) og forhreinsun, ef hún hefur farið fram.

Hlutfallslegur eðlismassi, D_4^{20}, skal skráður eins og hann er skilgreindur í 1.2, ásamt eðlisástandi hins mælda efnis.

Tilgreina skal allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

Tafla:

Notkunarsvið aðferðanna

Mæliaðferð	Eðlismassi		Mesta hugsanlega skriðseigja	Gildandi staðlar
	fast efni	vökvi		
1.4.1.1. Flotmælir		já	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050

Mæliaðferð	Eðlismassi		Mesta hugsanlega skriðseigja	Gildandi staðlar
	fast efni	vökvi		
1.4.1.2. Flotvog				
a) föst efni	já	já	5 Pa s	ISO 1183 (A)
b) vökvar		já	20 Pa s	ISO 901 og 758
1.4.1.3. Aðferð þar sem hlut er sökkt				DIN 53217
1.4.2. Vökvavog				ISO 3507
a) föst efni	já			ISO 1183(B), NF T 20-053
b) vökvar		já	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Vökvavog með loftsamanburði	já			DIN 55990 3. hluti, DIN 53243
1.4.4. Eðlismassa-sveiflumælir		já	5 Pa s	

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

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

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

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

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

Viðbætir

Frekari tæknilegar upplýsingar er t.d. að finna í eftirfarandi stöðlum.

1. **Uppdriftsaðferðir**

1.1. Flotmælir

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

1.2. Flotvog

Fyrir föst efni

ISO 1183	Aðferð A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Fyrir fljótandi efni

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 og ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Aðferð þar sem hlut er sökkt

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

2. **Aðferðir með vökvavog**

2.1. Fyrir fljótandi efni

ISO 3507	Pycnometers
ISO 758	Liquid chemical products; determination of density at 20 °C
DIN 12797	Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)

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

2.2. Fyrir föst efni

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

3. **Vökvavog með loftsamanburði**

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

A.4. GUFUÞRÝSTINGUR

1. AÐFERÐ

Flestar aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir (1. heimild). Grundvallarreglurnar eru settar fram í 2. og 3. heimild.

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um byggingu, bræðslumark og suðumark efnisins áður en þessi prófun er gerð.

Engin ein mælingaraðferð hentar fyrir allt gufuþrýstingssviðið. Því er mælt með nokkrum aðferðum til að mæla gufuþrýsting frá $< 10^{-4}$ til 10^5 Pa.

Óhreinindi hafa venjulega áhrif á gufuþrýstinginn en að hve miklu leyti svo er fer einkum eftir því hver óhreinindin eru.

Ef sýnið inniheldur rokgjörn óhreinindi sem gætu haft áhrif á niðurstöðuna má hreinsa efnið. Einnig getur verið heppilegt að tilgreina gufuþrýstinginn fyrir tæknilega efnið.

Í sumum þeirra aðferða, sem er lýst, er notast við búnað með málmhlutum og skal hafa það í huga þegar ætandi efni eru prófuð.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Gufuþrýstingur efnis er skilgreindur sem mettunarþrýstingur yfir föstu eða fljótandi efni. Við varmafræðilegt jafnvægi er gufuþrýstingur hreins efnis aðeins fall af hitastiginu.

SI-einingin, sem nota skal fyrir þrýsting, er paskal (Pa).

Einingar, sem áður hafa verið notaðar, ásamt tilheyrandi breytistuðlum, eru:

1 Torr (≡ 1 mm Hg)	$= 1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 loftþyngd	$= 1{,}013 \times 10^5$ Pa
1 bar	$= 10^5$ Pa

SI-eining hitastigs er kelvin (K).

Almenni gasfastinn R er 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

Sambandi hitastigs og gufuþrýstings er lýst með Clausius-Clapeyron-jöfnunni:

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

þar sem:

p = gufuþrýstingur efnisins í paskölum
ΔH_v = uppgufunarvarmi þess í J·$mól^{-1}$
R = almenni gasfastinn í J·$mól^{-1}$ K^{-1}
T = varmafræðilegt hitastig í K

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐANNA

Gerð er tillaga um sjö aðferðir sem hægt er að nota á mismunandi gufuþrýstingsbilum til að ákvarða gufuþrýsting. Í hverri aðferð er gufuþrýstingurinn ákvarðaður við mismunandi hitastig. Á takmörkuðu hitasviði er logri gufuþrýstings hreins efnis línulegt fall af andhverfu hitastigsins.

1.4.1. **Streymisaðferð**

Í streymisaðferðinni er mælt það suðumark sem samsvarar tilteknum þrýstingi.

Ráðlagt svið:

10^3–10^5 Pa.

Einnig hefur verið mælt með þessari aðferð til ákvörðunar á staðalsuðumarki og hún hentar til þess upp að 600 K.

1.4.2. **Kyrrstöðuaðferð**

Í kyrrstöðuferlinu er gufuþrýstingurinn ákvarðaður í lokuðu kerfi sem er í varmafræðilegu jafnvægi við tiltekið hitastig. Þessi aðferð hentar fyrir einþátta og fjölþátta föst efni og vökva.

Ráðlagt svið:

10–10^5 Pa.

Þessa aðferð er einnig hægt að nota á bilinu 1–10 Pa, að því tilskildu að farið sé varlega.

1.4.3. **Jafnþrýstisjá**

Þessi staðlaða aðferð er einnig kyrrstöðuaðferð en hentar venjulega ekki fyrir fjölþátta kerfi. Frekari upplýsingar er að finna í ASTM-aðferðinni D-2879-86.

Ráðlagt svið:

frá 100–10^5 Pa.

1.4.4. **Útsveimsaðferð: Gufuþrýstingsvog**

Magn efnis sem fer úr hólfi á hverri tímaeiningu í gegnum op af þekktri stærð er ákvarðað í lofttæmi þannig að magn efnisins sem fer aftur inn í hólfið sé óverulegt (t.d. með því að mæla slagið, sem gufustrókur framkallar á næmri vog, eða með mælingu á þyngdartapi).

Ráðlagt svið:

10^{-3} Pa til 1 Pa

1.4.5. **Útsveimsaðferð: Með þyngdartapi eða með gufugildru**

Aðferðin er byggð á mati á massa prófunarefnis sem streymir í gufuformi úr Knudsen-hólki (4. heimild), á hverri tímaeiningu, gegnum örop við ofurlofttæmingu. Ákvarða má massa gufunnar sem út streymir,

annaðhvort með því að ákvarða massatap hólksins eða með því að þétta gufuna við lágt hitastig og ákvarða magn þess efnis, sem gufar upp, með litskiljun. Gufuþrýstingurinn er reiknaður út með Hertz-Knudsen-jöfnunni.

Ráðlagt svið:

10^{-3} Pa til 1 Pa

1.4.6. **Gasmettunaraðferð**

Straumur af óhvarfgjörnu burðargasi er leiddur yfir efnið þannig að hann mettist af gufu þess. Efnismagnið, sem þekkt magn af burðargasi flytur með sér, má mæla annaðhvort með því að safna því í hentuga gildru eða með beintengdri greiningartækni. Sú niðurstaða er síðan notað til að reikna út gufuþrýstinginn við tiltekið hitastig.

Ráðlagt svið:

10^{-4} Pa til 1 Pa

Þessa aðferð er einnig hægt að nota á bilinu 1–10 Pa, að því tilskildu að farið sé varlega.

1.4.7. **Snúður**

Í snúðmælinum er hið eiginlega mælitæki lítil stálkúla sem svífur í segulsviði og snýst á miklum hraða. Gasþrýstingurinn er leiddur af þrýstingsbundinni hraðaminnkun stálkúlunnar.

Ráðlagt svið:

10^{-4} Pa til 0,5 Pa

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Hinar ýmsu aðferðir til að ákvarða gufuþrýsting eru bornar saman með tilliti til notkunar, endurtekningarnákvæmni, samanburðarnákvæmni, mælisviðs og gildandi staðla. Þetta er gert í eftirfarandi töflu.

Tafla:

Gæðaviðmiðanir

Mæliaðferð		Efni		Áætluð endurtekningarnákvæmni (1)	Áætluð samanburðarnákvæmni (1)	Ráðlagt svið	Gildandi staðall
		fast efni	vökvi				
1.4.1.	Streymisaðferð	með lágt bræðslumark	já	að 25%	að 25%	10^3 Pa til 2 × 10^3 Pa	—
				1–5%	1–5%	2 × 10^3 Pa til 10^5 Pa	—
1.4.2.	Kyrrstöðuaðferð	já	já	5–10%	5–10%	10–10^5 Pa (2)	NFT 20-048 (5. heimild)
1.4.3.	Jafnþrýstisjá	já	já	5–10%	5–10%	10^2–10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4.	Útsveimsaðferð, gufuþrýstingsvog	já	já	5–20%	5–50%	10^{-3} Pa til 1 Pa	NFT 20-047 (6. heimild)

Mæliaðferð		Efni		Áætluð endurtekningar-nákvæmni (1)	Áætluð samanburðar-nákvæmni (1)	Ráðlagt svið	Gildandi staðall
		fast efni	vökvi				
1.4.5.	Útsveimsað-ferð, þyngdartap	Já	já	10–30%	—	10^{-3} Pa til 1 Pa	—
1.4.6.	Gasmettun-araðferð	Já	Já	10–30%	að 50%	10^{-4} Pa til 1 Pa (2)	—
1.4.7.	Snúðaðferð	já	Já	10–20%	—	10^{-4} Pa til 0,5 Pa	—

(1) Háð hreinleika.

(2) Þessar aðferðir er einnig hægt að nota á bilinu 1–10 Pa, að því tilskildu að farið sé gætilega.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐUNUM

1.6.1. **Mæling í streymi**

1.6.1.1. *Búnaður*

Mælibúnaðurinn samanstendur venjulega af suðuíláti með áföstum kæli úr gleri eða málmi (mynd 1), búnaði til að mæla hitastigið og búnaði til að stjórna þrýstingi og mæla hann. Dæmigert mælitæki, eins og sýnt er á teikningunni, er búið til úr hitaþolnu gleri og gert úr fimm hlutum, sem eru:

Stórt rör, með tvöfalt byrði að hluta og samsett af slípuðu tengislíðri, kæli, kæliláti og inntaki.

Glerhólkur með Cottrell-dælu er festur í suðuhluta rörsins og er með gróft glermulningsyfirborð til að hindra „höggsuðu“ í suðuferlinu.

Hitastigið er mælt með viðeigandi hitaskynjara (t.d. viðnámshitamæli eða snertispennunema í hlíf) sem er sökkt í tækið að mælipunktinum (nr. 5, mynd 1) um hentugt inntak (t.d. slípað karltengi).

Nauðsynlegar tengingar eru við þrýstistillinn og mælibúnaðinn.

Belgur, sem gegnir hlutverki jafnarýmis, er tengdur við mælibúnaðinn með hárpípu.

Suðuílátið er hitað með hitaldi (t.d. hitarahylki) sem stungið er inn í glerbúnaðinn neðan frá. Rafstraumurinn, sem þarf til hitunar, er stilltur og honum stjórnað með snertispennunema.

Nauðsynlegt lofttæmi, milli 10^2 Pa og u.þ.b. 10^5 Pa, er framkallað með lofttæmisdælu.

Hentugur loki er notaður til að stilla æskilegan þrýsting með lofti eða köfnunarefni (mælisviðið er u.þ.b. 10^2 til 10^5 Pa) og til að lofta um tækið.

Þrýstingurinn er mældur með þrýstimæli.

1.6.1.2. *Mælingar*

Gufuþrýstingurinn er mældur með því að ákvarða suðumark sýnisins við mismunandi, tilgreind þrýstingsgildi milli u.þ.b. 10^3 og 10^5 Pa. Stöðugt hitastig við fastan þrýsting sýnir að suðumarki hefur verið náð. Með þessari aðferð er ekki hægt að mæla efni sem mynda froðu.

Efnið er sett í hreint og þurrt sýnisílát. Ef föst efni eru ekki í duftformi getur það valdið vandræðum en hjá þessu má stundum komast með því að hita kælislíðrið. Þegar ílátið hefur verið fyllt er búnaðinum lokað við kragann og efnið afgasað. Stillt er á lægsta þrýsting sem óskað er eftir og kveikt á hitakerfinu. Samtímis er hitaneminn tengdur við rita.

Jafnvægi er náð þegar lesa má af stöðugt suðumark við jafnan þrýsting. Þess þarf að gæta sérstaklega að forðast höggsuðu. Auk þess verður þéttingin á kælinum að vera alger. Þegar gufuþrýstingur fastra efna með lágt bræðslumark er ákvarðaður skal þess gætt að eimsvalinn stíflist ekki.

Eftir að þessi jafnvægispunktur hefur verið skráður er stillt á meiri þrýsting. Haldið er áfram á þennan hátt þar til 10^5 Pa er náð (u.þ.b. 5–10 mælipunktar alls). Til öryggis skal endurtaka jafnvægispunktana við lækkandi þrýsting.

1.6.2. **Kyrrstöðumæling**

1.6.2.1. *Búnaður*

Búnaðurinn samanstendur af íláti fyrir sýnið og hitunar- og kælikerfi til að stjórna hitastigi sýnisins og mæla hitastigið. Einnig eru í búnaðinum tæki til að stilla og mæla þrýstinginn. Myndir 2a og 2b sýna þær grundvallarreglur sem um er að ræða.

Sýnishólfið (mynd 2a) er afmarkað á annarri hliðinni með viðeigandi hálofttæmisloka. U-rör, sem geymir hentugan þrýstimælivökva, er tengt við hina hliðina. Annar endi U-rörsins greinist og tengist lofttæmis-dælunni, köfnunarefnishylkinu eða loftræstilokanum og þrýstimæli.

Nota má þrýstimæli með þrýstivísi í stað U-rörsins (mynd 2b).

Til að stjórna hitastigi sýnisins er sýnisílátinu, ásamt loka og U-röri eða þrýstimæli, komið fyrir í baði sem haldið er við fast hitastig ± 0,2 K. Hitinn er mældur á sýnisílátinu utanverðu eða í ílátinu sjálfu.

Lofttæmisdæla með andstreymis kæligildru er notuð til að lofttæma búnaðinn.

Með aðferð 2a er gufuþrýstingur efnisins mældur óbeint með núllvísi. Með því móti er tekið mið af því að eðlismassi vökvans í U-rörinu breytist við miklar hitabreytingar.

Eftirfarandi vökvar henta til notkunar sem núllvísar fyrir U-rörið, eftir þrýstingssviði og efnrænum eiginleikum prófunarefnisins: sílíkonvökvar og þalöt. Prófunarefnið má hvorki leysast merkjanlega í vökvanum í U-rörinu né hvarfast við hann.

Í þrýstimælinn má nota kvikasilfur á sviðinu frá venjulegum loftþrýstingi til 10^2 Pa, en sílíkonvökvar og þalöt henta frá undir 10^2 Pa niður í 10 Pa. Rafrýmdarþrýstimæla með hitahimnu má jafnvel nota við minna en 10^{-1} Pa. Einnig eru til aðrir þrýstimælar sem hægt er að nota við minna en 10^2 Pa.

1.6.2.2. *Mælingar*

Áður en mæling fer fram skal hreinsa og þurrka vandlega alla hluta búnaðarins sem sýndur er á mynd 2.

Í aðferð 2a er U-rörið síðan fyllt með vökvanum sem valinn hefur verið en áður en mælingar eru gerðar skal afgasa vökvann við háan hita.

Prófunarefninu er komið fyrir í búnaðinum sem er síðan lokað og hitinn er lækkaður nægilega fyrir afgösun. Hitinn þarf að vera nægilega lágur til að tryggja að loftið sogist út en þetta má ekki hafa áhrif á efnasamsetninguna þegar um fjölþáttakerfi er að ræða. Ef þörf krefur má ná jafnvægi hraðar með því að hræra í efninu.

Sýnið má ofurkæla með t.d. fljótandi köfnunarefni (og gæta þess að koma í veg fyrir þéttingu lofts eða dæluvökva) eða blöndu af etanóli og þurrís. Til mælinga við lágan hita skal nota hitastillt bað sem er tengt við ofurkuldahald (e. *ultra-cryomat*).

Loft er sogað úr tækinu í nokkrar mínútur með lokann fyrir ofan sýnisílátið opinn. Lokanum er síðan lokað og sýnið kælt niður í lægsta, fyrirhugaða hita. Ef nauðsyn krefur skal afgösunin endurtekin nokkrum sinnum.

Þegar sýnið er hitað eykst gufuþrýstingurinn. Við þetta breytist jafnvægi vökvans í U-rörinu. Til að vinna gegn því er köfnunarefni eða lofti hleypt inn í búnaðinn um loka þar til þrýstingsvísivökvinn nær núllstöðu á ný. Lesa má þrýstinginn, sem þarf fyrir þetta, af nákvæmum þrýstimæli við stofuhita. Þessi þrýstingur svarar til gufuþrýstings efnisins við þetta tiltekna mælihitastig.

Aðferð 2b er svipuð en gufuþrýstingurinn er lesinn af beint.

Samband hitastigs og gufuþrýstings er ákvarðað með hæfilega litlum bilum (u.þ.b. 5–10 mælipunktum alls) upp að því hámarki sem óskað er eftir. Til öryggis skal endurtaka mælingar sem gerðar eru við lágt hitastig.

Ef gildi, sem fást við endurtekinn aflestur, falla ekki saman við ferilinn sem fékkst með hækkandi hitastigi getur eitt af eftirtöldu hafa valdið því:

1. Enn er loft í sýninu (t.d. efni með mikla seigju) eða efni með lágt suðumark sem losnar/losna við hitun og má þá fjarlægja með sogi eftir frekari ofurkælingu;

2. Kælihitinn er ekki nægilega lágur. Í því tilviki er fljótandi köfnunarefni notað sem kælimiðill.

   Eigi 1. eða 2. liður við þarf að endurtaka mælingarnar.

3. Efnið hvarfast á hitasviðinu sem er til athugunar (brotnar t.d. niður eða fjölliðast).

1.6.3. **Jafnþrýstisjá**

Fullkomna lýsingu á þessari aðferð má finna í 7. heimild. Meginregla mælibúnaðarins er sýnd á mynd 3. Líkt og kyrrstöðuaðferðin, sem lýst er í 1.6.2, hentar jafnþrýstisjáin til rannsókna á föstum efnum og vökvum.

Ef um vökva er að ræða er efnið sjálft notað sem vökvi í aukaþrýstimælinum. Í jafnþrýstisjána er sett nægilega mikið af vökvanum til að fylla kúluna og stuttarm þrýstimælihlutans. Jafnþrýstisjáin er tengd við lofttæmingarkerfi og tæmd en síðan fyllt af köfnunarefni. Tæming og hreinsun kerfisins er endurtekin tvisvar til að fjarlægja leifar af súrefni. Fylltri jafnþrýstisjánni er komið fyrir í láréttri stöðu þannig að sýnið leggist í þunnt lag í sýniskúlunni og þrýstimælihlutanum (U-hlutanum). Þrýstingur kerfisins er lækkaður í 133 Pa og sýnið hitað gætilega þar til það rétt sýður (til að fjarlægja uppleyst, bundin gös). Jafnþrýstisjánni er síðan komið þannig fyrir að sýnið renni aftur inn í kúluna og stuttarm þrýstimælisins og hvort tveggja fyllist af vökva. Haldið er sama þrýstingi og við afgösun, oddurinn á sýniskúlunni er hitaður með litlum loga þar til gufan, sem losnar úr sýninu, þenst nægilega mikið út til að hluti sýnisins færist úr efri hluta kúlunnar og armi þrýstimælisins og inn í þrýstimælihluta jafnþrýstisjárinnar svo að til verður gufufyllt, köfnunarefnislaust rými.

Jafnþrýstisjánni er síðan komið fyrir í baði með stöðugu hitastigi og þrýstingur köfnunarefnisins er stilltur þar til hann er jafn þrýstingi sýnisins. Þrýstimælihluti jafnþrýstisjárinnar sýnir þrýstingsjafnvægið. Við jafnvægi er gufuþrýstingur köfnunarefnisins jafn gufuþrýstingi efnisins.

Ef um föst efni er að ræða eru notaðir þrýstimælisvökvarnir sem taldir eru upp í 1.6.2.1, háð þrýstingi og hitasviði. Afgasaður þrýstimælisvökvinn er settur í bungu á langarmi jafnþrýstisjárinnar. Síðan er fasta efnið, sem á að rannsaka, sett í kúluna og afgasað við hækkað hitastig. Því næst er jafnþrýstisjánni hallað þannig að vökvinn í þrýstimælinum geti runnið inn í U-rörið. Mæling á gufuþrýstingi, sem fall af hitastigi, er gerð samkvæmt 1.6.2.

1.6.4. **Útsveimsaðferð: gufuþrýstingsvog**

1.6.4.1. *Búnaður*

Ýmsum gerðum búnaðarins er lýst í heimildunum (1. heimild). Búnaðurinn, sem er lýst hér, sýnir meginregluna sem er notuð (mynd 4). Mynd 4 sýnir helstu íhluti búnaðarins: hálofttæmisílát úr ryðfríu stáli eða gleri, tæki til að framkalla og mæla lofttæmi og innbyggðir íhlutir til að mæla gufuþrýstinginn á vog. Í búnaðinum eru eftirfarandi innbyggðir íhlutir:

— Uppgufunarofn (e. *evaporator furnace*) með kraga og snúningsinntaki. Uppgufunarofninn er sívalt hylki, gert úr t.d. kopar eða efnaþolinni málmblöndu með góðri varmaleiðni. Einnig er hægt að nota

glerílát með koparvegg. Ofninn er um 3–5 cm að þverməli og 2–5 cm að hæð. Á honum eru eitt til þrjú op af mismunandi stærðum fyrir gufustrauminn. Ofninn er hitaður annaðhvort neðan frá með hitaplötu eða með hitavafningi sem er settur utan um hann. Til að hindra að hita leiði niður í botnplötuna er hitarinn tengdur við hana með málmi með lítilli varmaleiðni (nýsilfri (e. *nickel-silver*) eða krómnikkelstáli), t.d. pípu úr nýsilfri sem er tengd snúningsinntaki ef notaður er ofn með fleiri en einu opi. Þessi tilhögun hefur þann kost að mögulegt er að stinga inn koparstöng. Það gerir kleift að kæla utanfrá með því að nota kælibað.

— Ef koparofnlokið er með þremur opum með mismunandi þverməli og staðsett þannig að 90° horn sé á milli þeirra er unnt að ná yfir mismunandi gufuþrýstingssvið innan heildarmælisviðsins (opin eru milli u.þ.b. 0,30–4,50 mm í þvermál). Stór op eru notuð fyrir lágan gufuþrýsting og öfugt. Með því að snúa ofninum er hægt að stilla á opið sem óskað er eftir eða á millistöðu í gufustraumnum (ofnop — hlíf — vogarskál) og sameindastraumnum er beint eða honum endurkastað um ofnopið á vogarskálina. Til að mæla hitastig efnisins er komið fyrir snertispennunema eða viðnámshitamæli á hentugum stað.

— Fyrir ofan hlífina er vogarskál á afar næmri örvog (sjá hér á eftir). Vogarskálin er um 30 mm í þvermál. Gullhúðað ál er heppilegt efni.

— Sívalur kælikassi úr látúni eða kopar umlykur vogarskálina. Á honum eru mismunandi op, eftir gerð vogarinnar, fyrir vogararminn og hlífarop fyrir sameindastrauminn og skal vera öruggt að gufan þéttist fullkomlega á vogarskálinni. Hiti er leiddur út, t.d. með koparstöng sem er tengd við kælikassann. Stöngin liggur í gegnum botnplötuna og er varmaeinangruð frá henni, t.d. með röri úr krómnikkelstáli. Stönginni er sökkt ofan í Dewar-flösku með fljótandi köfnunarefni undir botnplötunni eða fljótandi köfnunarefni er beint í gegnum stöngina. Kælikassanum er haldið með þessu móti við u.þ.b. – 120° C. Vogarskálin er látin kólna með útgeislun eingöngu og er það fullnægjandi fyrir þrýstingssviðið sem er til rannsóknar (kæling í um 1 klst. áður en mæling hefst).

— Vogin er staðsett fyrir ofan kælikassann. Hentugar vogir eru t.d. hánæm tveggja arma rafeindaörvog (8. heimild) eða hánæmur hverfispólumælir (sjá OECD-viðmiðunarreglu 104 um prófanir, útgáfu 12.05.81),

— í botnplötunni eru einnig rafmagnstengingar fyrir snertispennunema (eða viðnámshitamæla) og hitaspólur,

— lofttæmi er framkallað í ílátinu með hlutalofttæmisdælu eða hálofttæmisdælu (nauðsynlegt lofttæmi er um 1 til 2 x 10^{-3} Pa, næst eftir dælingu í 2 klst.). Þrýstingnum er stjórnað með hentugum jónunarþrýstimæli.

1.6.4.2. *Mælingar*

Ílátið er fyllt með prófunarefninu og lokið sett á. Hlífinni og kælikassanum er rennt yfir ofninn. Búnaðinum er lokað og kveikt á lofttæmisdælunum. Lokaþrýstingur áður en mælingar hefjast skal vera u.þ.b. 10^{-4} Pa. Kæling kælikassans hefst við 10^{-2} Pa.

Þegar nauðsynlegu lofttæmi er náð er byrjað á kvörðunarrununni við lægsta fyrirhugaða hitastigið. Stillt er á viðeigandi op á lokinu og gufustraumurinn fer í gegnum hlífina beint fyrir ofan opið og lendir á kældu vogarskálinni. Vogarskálin verður að vera nægilega stór til að öruggt sé að allur straumurinn, sem beint er í gegnum hlífina, lendi á skálinni. Skriðþungi gufustraumsins verkar sem kraftur á vogarskálina og sameindirnar þéttast á köldu yfirborði hennar.

Skriðþunginn, og þéttingin jafnframt honum, kalla fram merki á ritanum. Mat á merkjunum veitir tvenns konar upplýsingar:

1. Í búnaðinum, sem er lýst, er gufuþrýstingurinn ákvarðaður beint út frá skriðþunganum á vogarskálinni (ekki er nauðsynlegt að þekkja sameindaþyngdina til þess (2. heimild)). Taka verður tillit til rúmfræðilegra þátta þegar álestur er metinn, s.s. stærðar ofnopsins og aðfallshorns sameinda-straumsins.

2. Mæla má massa þéttingarinnar samtímis og reikna hraða uppgufunar út frá honum. Gufuþrýstinginn má einnig reikna út frá hraða uppgufunar og sameindaþyngd með því að nota Hertz-jöfnuna (2. heimild).

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

þar sem

G = uppgufunarhraði (kg s^{-1} m^{-2})
M = sameindamassi (g $mól^{-1}$)
T = hitastig (K)
R = almenni gasfastinn (J·$mól^{-1}$ K^{-1})
p = gufuþrýstingur (Pa)

Eftir að nauðsynlegu lofttæmi er náð er byrjað á mælingaröðinni við lægsta fyrirhugaða mælihitastigið.

Fyrir frekari mælingar er hitastigið hækkað um lítil bil í einu þar til fyrirhuguðu hámarkshitastigi er náð. Sýnið er síðan kælt á ný og skrá má annan gufuþrýstingsferil. Ef seinni prófunarkeyrslan staðfestir ekki niðurstöðurnar úr fyrri keyrslunni er hugsanlegt að efnið sé að brotna niður á því hitasviði sem mælt er á.

1.6.5. **Útsveimsaðferð — með þyngdartapi**

1.6.5.1. *Búnaður*

Útsveimsbúnaðurinn samanstendur af eftirfarandi grunnhlutum:

— geymi sem unnt er að hitastilla og lofttæma og inniheldur útsveimshólfin,

— hálofttæmisdælu (t.d. sveimdælu (e. *diffusion pump*) eða sameindahverfildælu (e. *turbomolecular pump*)) með sogmæli,

— gildru með fljótandi köfnunarefni eða þurrís.

Á mynd 5 er sýnt dæmi um rafmagnshitaðan lofttæmisgeymi úr áli með fjórum útsveimshólfum úr ryðfríu stáli. Þynna úr um 0,3 mm þykku, ryðfríu stáli er með útsveimsop sem er 0,2–1,0 mm í þvermál og er fest við útsveimshólfið með skrúfuðu loki.

1.6.5.2. *Mælingar*

Fyllt er með viðmiðunar- og prófunarefni í hvert útsveimshólf, málmhimnan með opinu er fest tryggilega með skrúfaða lokinu og hvert hólf er vigtað með nákvæmni upp á 0,1 mg. Hólfinu er komið fyrir í hitastilltum búnaðinum sem er síðan lofttæmdur niður fyrir einn tíunda af þeim þrýstingi sem búist er við. Með fyrir fram ákveðnum millibilum, sem geta verið frá 5–30 klst., er lofti hleypt inn í búnaðinn og massatap í útsveimshólfinu ákvarðað með endurvigtun.

Til að tryggja að rokgjörn óhreinindi hafi ekki áhrif á niðurstöðurnar er hólfið endurvigtað með fyrir fram ákveðnum millibilum til að athuga hvort uppgufunarhraðinn sé stöðugur yfir minnst tvö slík millibil.

Gufuþrýstingurinn p í útsveimshólfinu er gefinn með:

$$p = \frac{m}{KAt}\sqrt{\frac{2\pi RT}{M}}$$

þar sem

p = gufuþrýstingur (Pa)
m = massi þess efnis sem hverfur úr hólfinu á tímanum t (kg)
t = tími (s)
A = flatarmál opsins (m^2)
K = leiðréttingarstuðull
R = almenni gasfastinn (J·$mól^{-1}$ K^{-1})
T = hitastig (K)

M = sameindamassi (kg mól^{-1})

Leiðréttingarstuðullinn K ræðst af hlutfallinu milli lengdar á móti radíusi hringlaga opsins:

hlutfall	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Jöfnuna hér á undan má rita svo:

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

þar sem. $E = \frac{1}{KA}\sqrt{2\pi R}$ er útsveimshólfsfastinn.

Útsveimshólfsfastann E má ákvarða með viðmiðunarefnum (2,9) samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

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

þar sem:

p(r) = gufuþrýstingur viðmiðunarefnisins (Pa)
M(r) = sameindamassi viðmiðunarefnisins (kg × mol^{-1})

1.6.6. **Gasmettunaraðferð**

1.6.6.1. *Búnaður*

Dæmigerður búnaður fyrir þessa prófun samanstendur af nokkrum íhlutum sem sýndir eru á mynd 6a og er lýst hér á eftir (1. heimild).

Óhvarfgjörn lofttegund:

Burðargasið má ekki hvarfast við prófunarefnið. Yfirleitt dugar að nota köfnunarefni en í stöku tilvikum getur þurft að nota aðrar lofttegundir (10. heimild). Gasið, sem er notað, verður að vera þurrt (sjá 4. skýringarlið við mynd 6a: rakaskynjari).

Flæðisstjórnun:

Hentugt gasstýrikerfi er nauðsynlegt til að tryggja stöðugt og stýrt flæði gegnum mettunarsúluna.

Gufugildrur:

Slíkar gildrur fara eftir eiginleikum viðkomandi sýnis og greiningaraðferðinni. Gufunni þarf að safna megindlega og í formi sem leyfir eftirfylgjandi greiningu. Fyrir sum prófunarefni henta gildrur sem innihalda vökva, s.s. hexan eða etýlenglýkól. Fyrir önnur geta föst ísogsefni hentað.

Í stað þess að beita gufugildru og eftirfylgjandi greiningu má nota aðferðir til samfelldrar greiningar, á borð við litskiljun, til megindlegrar ákvörðunar á efnismagninu sem þekkt magn af burðargasi ber burt. Enn fremur er hægt að mæla massatap sýnisins.

Varmaskiptir:

Fyrir mælingar við mismunandi hitastig getur verið nauðsynlegt að bæta varmaskipti við búnaðinn.

Mettunarsúla:

Prófunarefnið er fellt út úr lausn á heppilegt, óvirkt burðarefni. Húðuðu, óvirku burðarefninu er þjappað í mettunarsúluna og skulu mál hennar og flæðihraðinn vera með þeim hætti að fullkomin mettun burðargassins sé tryggð. Mettunarsúlan skal vera hitastillt. Til mælinga við hærri hita en stofuhita skal hita svæðið milli mettunarsúlunnar og gildranna til að koma í veg fyrir þéttingu prófunarefnisins.

Til að minnka massaflutning af völdum sveims (e. *diffusion*) má koma fyrir hárpípu næst á eftir mettunarsúlunni (mynd 6b).

1.6.6.2. *Mælingar*

Undirbúningur mettunarsúlu:

Lausn af prófunarefninu í mjög rokgjörnum leysi er bætt í hæfilegt magn af stuðningsefni. Nota skal nægilega mikið af prófunarefni til að viðhalda mettun meðan á prófuninni stendur. Leysirinn er látinn gufa algerlega upp í lofti eða hverfieimi og vel blandað efnið sett í mettunarsúluna. Eftir að sýnið hefur verið hitastillt er þurrt köfnunarefni leitt í gegnum búnaðinn.

Mæling:

Gildrurnar, eða nemi fyrir beintengda greiningu, eru tengdar við frárennslisrör súlunnar og tíminn skráður. Flæðihraðinn er athugaður í upphafi og með reglulegu millibili meðan á tilrauninni stendur með bólumæli (eða samfellt með massastreymismæli).

Mæla skal þrýsting við úttak mettunarsúlunnar. Það má gera annaðhvort:

a) með því að setja þrýstimæli milli mettunarsúlunnar og gildranna (þetta getur verið óheppilegt þar eð það eykur bæði dautt rými og ásogsyfirborð) eða

b) með því að ákvarða þrýstingsfallið í viðkomandi gildrukerfi í sérstakri tilraun sem fall af flæðihraða (getur verið fremur óheppilegt fyrir vökvagildrur).

Tíminn, sem þarf til að safna því magni af prófunarefni sem er nauðsynlegt fyrir hinar ýmsu greiningaraðferðir, er ákvarðaður með undirbúningskeyrslum eða mati. Í stað þess að safna efninu til frekari greiningar má nota megindlega, beintengda greiningartækni (t.d. litskiljun). Áður en gufuþrýstingur við tiltekið hitastig er reiknaður út skulu fara fram undirbúningskeyrslur til að ákvarða þann hámarksflæðihraða sem mettar burðargasið fullkomlega með efnisgufu. Mettun er tryggð ef burðargasið er leitt nægilega hægt í gegnum mettunarsúluna til að minni hraði gefi ekki hærri reiknaðan gufuþrýsting.

Greiningaraðferðin ræðst af eðli efnisins sem prófað er (t.d. gasgreining eða fellingarmæling).

Efnismagnið, sem flyst með þekktu rúmmáli af burðargasi, er ákvarðað.

1.6.6.3. *Útreikningur á gufuþrýstingi*

Gufuþrýstingur er reiknaður út frá eðlismassa gufunnar, W/V, með jöfnunni:

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

þar sem:

p = gufuþrýstingur (Pa)
W = massi uppgufaðs prófunarefnis (g)
V = rúmmál mettaðs gass (m^3)
R = almenni gasfastinn ($J \cdot mól^{-1}\ K^{-1}$)
T = hitastig (K)
M = sameindamassi prófunarefnisins ($g\ mól^{-1}$)

Mælt rúmmál verður að leiðrétta fyrir mismuninum á þrýstingi og hitastigi flæðimælisins og hitastilltu mettunarsúlunnar. Ef flæðimælirinn er hafður á eftir gufugildrunni getur verið nauðsynlegt að leiðrétta með tilliti til efna, ef einhver eru, sem gufa upp í gildrunni (1. heimild).

1.6.7. **Snúður (8., 11. og 13. heimild)**

1.6.7.1. *Búnaður*

Snúðaðferðina má framkvæma með seigjumæli með snúði eins og sýnt er á mynd 8. Á mynd 7 er uppdráttur af uppsetningu tilraunatækjanna.

Mælitækið er venjulega mælihaus með snúði sem er settur í hitastillt hús (sem er stillt með innan við 0,1 °C nákvæmni). Sýnisílátið er sett í hitastillt hús (sem er stillt með innan við 0,01 °C nákvæmni) og öllum öðrum hlutum tækjabúnaðarins er haldið við hærra hitastig til að koma í veg fyrir þéttingu. Hálofttæmisdæla er tengd við kerfið með hálofttæmislokum.

Snúðmælihausinn er gerður úr stálkúlu (4–5 mm í þvermál) í röri. Kúlunni er haldið svífandi á sama stað í segulsviði, oftast með síseglum og stýrispólum.

Spólurnar mynda snúningssvið sem valda snúningi kúlunnar. Þversegulmögnun kúlunnar, sem er lítil en jafnan einhver, má mæla með skynjaraspólum og mæla þannig snúningshraða kúlunnar.

1.6.7.2. *Mælingar*

Þegar kúlan hefur náð tilteknum snúningshraða, v(o), (venjulega um 400 snúningum á sekúndu) er orkustreymið stöðvað og snúningshraðinn minnkar vegna núnings kúlunnar við gasið.

Minnkun snúningshraðans er mæld sem fall af tíma. Þar eð núningsmótstaðan, sem segulsvifið veldur, er óveruleg í samanburði við núningsmótstöðu gassins fæst gasþrýstingurinn p með jöfnunni:

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

þar sem:

$\bar{c}$ = meðalhraði gassameindanna
r = radíus kúlunnar
ρ = eðlismassi kúlunnar
σ = stuðull sem lýsir yfirfærslu skriðþunga í stefnu snertils (ε = 1 fyrir fullkomlega kúlulaga yfirborð kúlunnar)
t = tími
v(t) = snúningshraði að liðnum tímanum t
v(o) = upphafssnúningshraði

Þessa jöfnu má einnig rita svo:

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

þar sem t_n og t^{n-1} er tíminn sem tiltekinn fjöldi snúninga, N, tekur. Þessi tímabil, t_n og t^{n-1}, fylgja hvort á eftir öðru og $t_n > t^{n-1}$.

Meðalhraði gassameindarinnar $\bar{c}$

er gefinn með:

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

þar sem:

T = hitastig,

R = almenni gasfastinn
M = sameindamassi

2. **GÖGN**

Í öllum framangreindum aðferðum skal gufuþrýstingurinn ákvarðaður við a.m.k. tvö hitastig. Æskilegt er mæla hann við a.m.k. þrjú mismunandi hitastig á bilinu 0–50 °C til þess að kanna hvort gufuþrýstingsferillinn er línulegur.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða aðferð er notuð,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi) og forhreinsun, ef hún hefur farið fram,

— minnst tvö gufuþrýstings- og hitastigsgildi, helst á bilinu 0–50 °C,

— öll óunnin gögn,

— ferill sem er log p á móti 1/T,

— mat á gufuþrýstingi við 20 eða 25 °C.

Ef ummyndun á sér stað (ástandsbreyting, niðurbrot) skulu eftirfarandi upplýsingar fylgja:

— eðli breytingarinnar,

— hitastigið þegar breytingin verður við loftþrýsting,

— gufuþrýstingur við 10 og 20 °C undir ummyndunarhita og 10 og 20 °C fyrir ofan hann (nema ummyndunin sé úr föstu efni í gas).

Tilgreina skal allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

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

5) NF T 20-048 AFNOR (September 85) Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10-1 to 105 Pa — Static method.

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

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

8) G. Messer, P. Rohl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, 'Vol. 5 (4), bls. 2440.

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

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

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

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

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

1. viðbætir

Matsaðferð

INNGANGUR

Reiknuð gildi fyrir gufuþrýsting má nota:

— til að ákvarða hvaða tilraunaaðferð er hentug,

— sem matsgildi eða viðmiðunarmörk þegar ekki er unnt að nota tilraunaaðferðina af tæknilegum ástæðum (þ.m.t. þegar gufuþrýstingurinn er mjög lítill),

— til aðstoðar við að greina í hvaða tilvikum er réttlætanlegt að sleppa tilraunamælingum vegna þess að gufuþrýstingurinn er að öllum líkindum < 10^{-5} Pa við umhverfishita.

MATSAÐFERÐ

Áætla má gufuþrýsting vökva og fastra efna með því að nota aðlagaða Watson-fylgni (heimild (a)). Einu tilraunagögnin sem þörf er á er venjulegt suðumark. Aðferðina er hægt að nota á þrýstingssviðinu frá 10^{5} Pa til 10^{-1} Pa.

Ítarlegar upplýsingar um aðferðina eru gefnar í „Handbook of Chemical Property Estimation Methods“ (heimild (b)).

REIKNIAÐFERÐ

Samkvæmt heimild (b) er gufuþrýstingurinn reiknaður út með eftirfarandi hætti:

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

þar sem:

T = hitastigið sem miðað er við
T_b = venjulegt suðumark
P^{vp} = gufuþrýstingur við hitastigið T
ΔH_{vb} = uppgufunarvarmi
ΔZ_b = þjöppunarstuðull (áætlaður 0,97)
m = reynslustuðull sem er háður eðlisástandinu við hitastigið sem miðað er við

Ennfremur gildir:

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

þar sem K_F er reynslustuðull sem tekur mið af skautun efnisins. K_F-stuðlarnir fyrir ýmsar tegundir efnasambanda eru taldir upp í heimild (b).

Oft liggja fyrir gögn þar sem suðumark við lækkaðan þrýsting er gefið upp. Í slíkum tilvikum er gufuþrýstingurinn reiknaður samkvæmt heimild (b) með eftirfarandi hætti:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta Hv_1}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)m\frac{T_1}{T} - 2m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_1}\right]$$

þar sem T_1 er suðumark við lækkaða þrýstinginn P_1.

SKÝRSLA

Ef matsaðferðin er notuð skal skýrslunni fylgja tæmandi greinargerð fyrir útreikningi.

HEIMILDIR

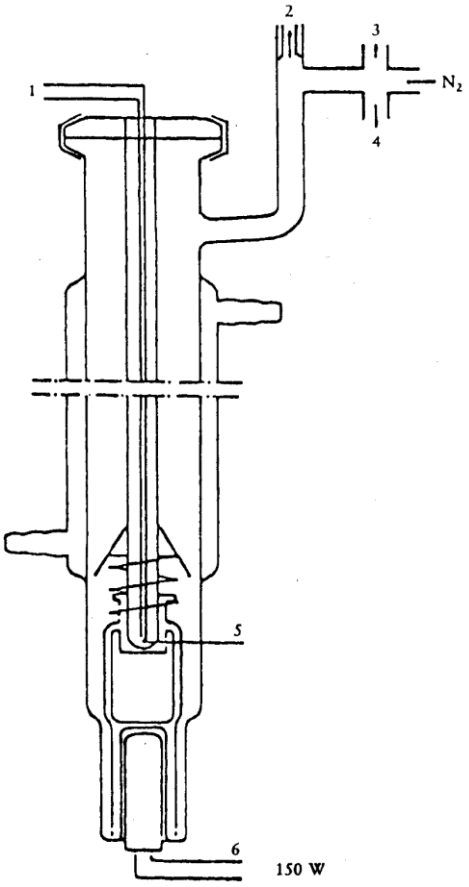
a) K.M. Watson, Ind. Eng. Chem., 1943, vol. 35, bls. 398.

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

2. viðbætir

Mynd 1

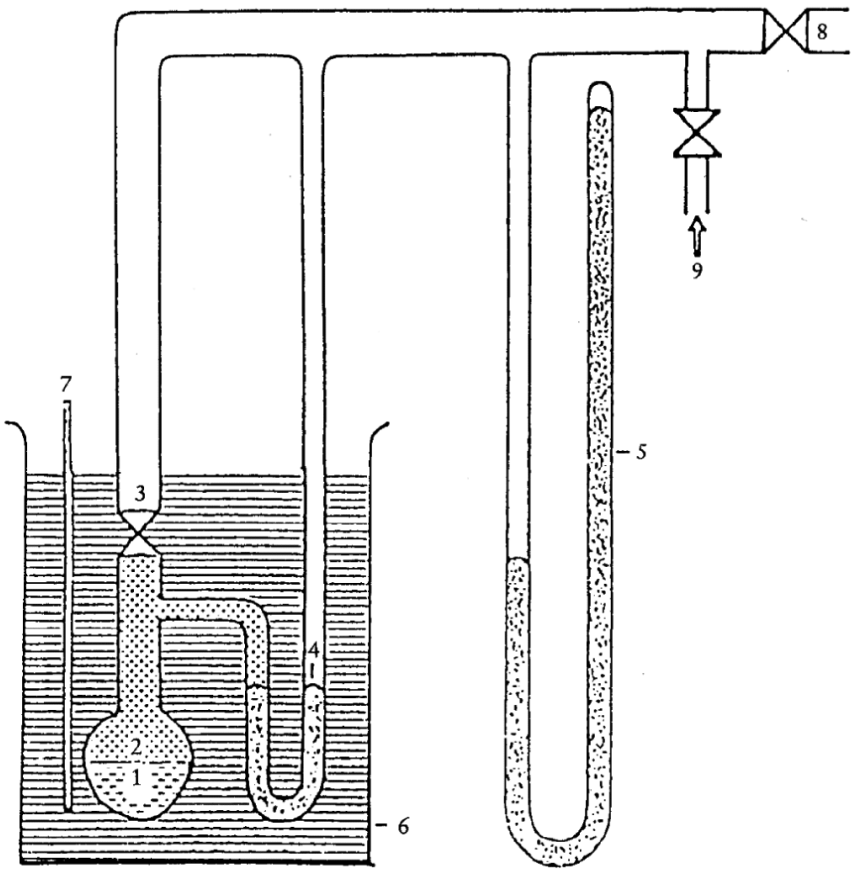
Búnaður til ákvörðunar á gufuþrýstingsferli samkvæmt streymisaðferðinni



1 = Snertispennunemi
2 = Lofttæmisjafnarými
3 = Þrýstimælir
4 = Lofttæmi
5 = Mælipunktur
6 = Hitald, u.þ.b. 150 vött

Mynd 2a

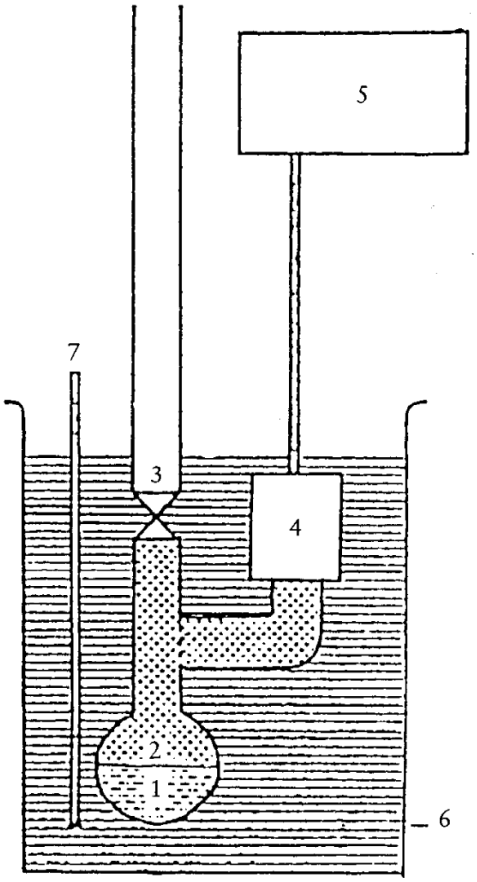
Búnaður til ákvörðunar á gufuþrýstingsferli samkvæmt kyrrstöðuaðferðinni (með notkun U-rörsþrýstimælis)



1. Prófunarefni
2. Gufufasi
3. Hálofttæmisloki
4. U-rör (aukaþrýstimælir)
5. Þrýstimælir (e. *manometer*)
6. Hitabað
7. Hitamælibúnaður
8. Til lofttæmisdælu
9. Loftræsting

Mynd 2b

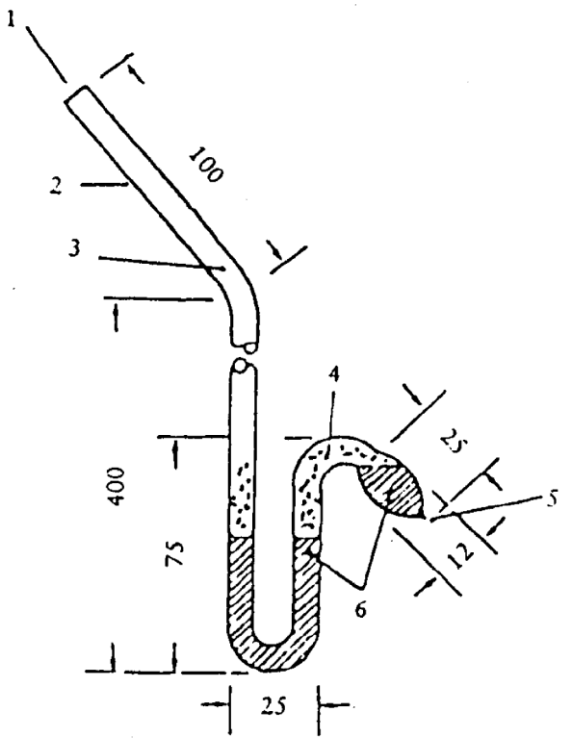
Búnaður til ákvörðunar á gufuþrýstingsferli samkvæmt kyrrstöðuaðferðinni (með notkun þrýstivísis)



1. Prófunarefni
2. Gufufasi
3. Hálofttæmisloki
4. Þrýstimælir (e. *pressure gauge*)
5. Þrýstivísir
6. Hitabað
7. Hitamælibúnaður

Mynd 3

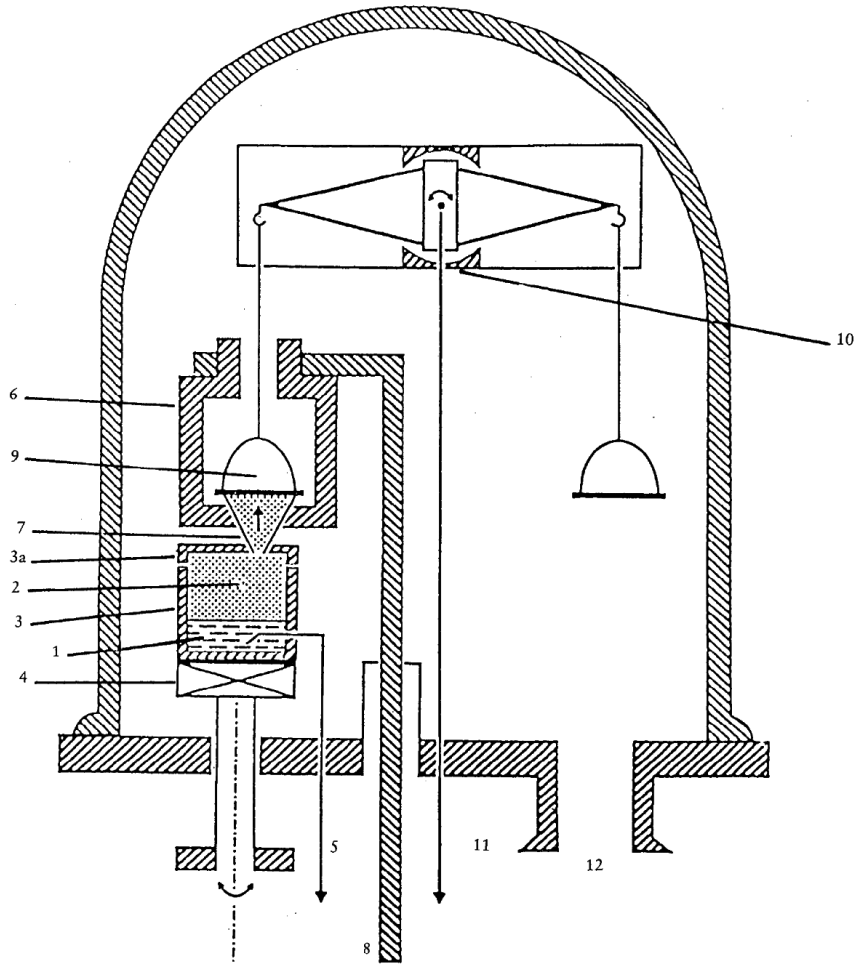
Jafnþrýstisjá (sjá 7. heimild)



1. Til kerfis til að stilla og mæla þrýsting
2. Rör sem er 8 mm að ytra þvermáli
3. Þurrt köfnunarefni í þrýstikerfi
4. Gufa af sýninu
5. Lítill broddur
6. Fljótandi sýni

Mynd 4

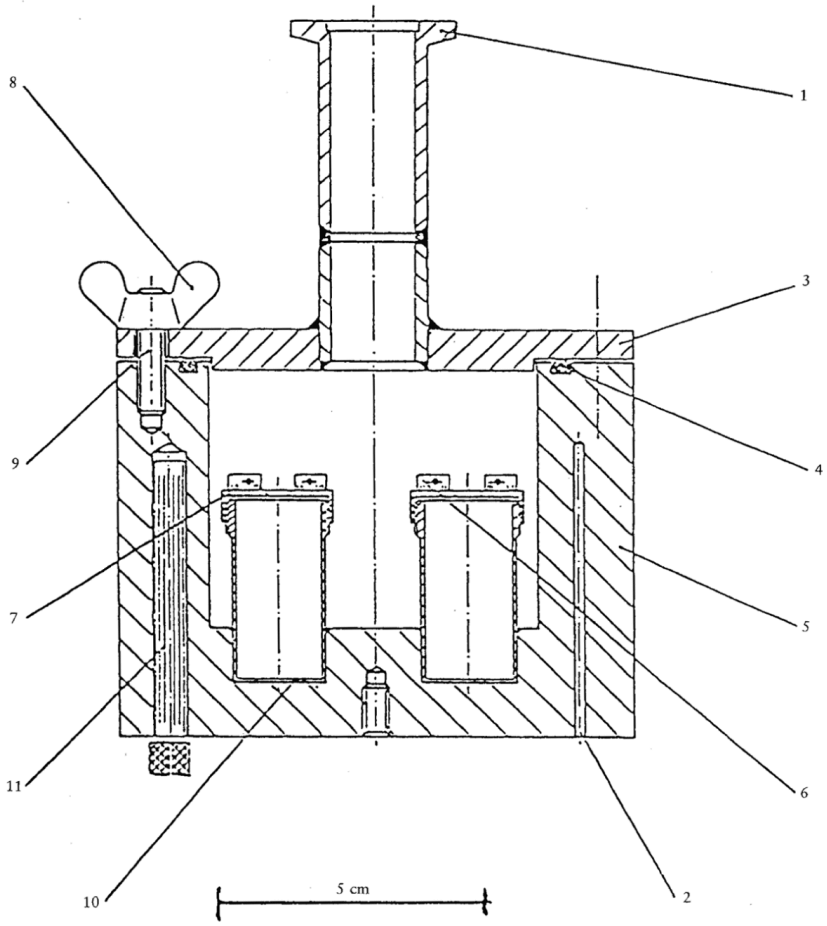
Búnaður til ákvörðunar á gufuþrýstingsferli samkvæmt aðferð með gufuþrýstingsvog



1. Prófunarefni
2. Gufufasi með gufustreymi
3. Uppgufunarofn með snúningsinntaki
3a. Ofnlok með opi
4. Upphitun (kæling) ofns
5. Mæling á hitastigi sýnisins
6. Kælikassi
7. Hlíf
8. Kælistöng fyrir kælikassa
9. Vogarskál
10. Örvog
11. Til rita
12. Til hálofttæmisdælu

Mynd 5

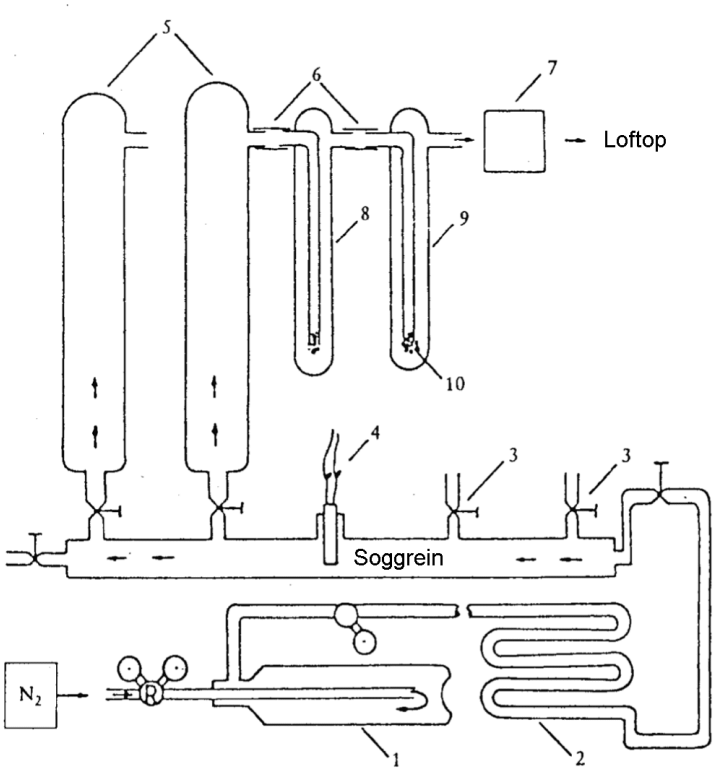
Dæmi um búnað til uppgufunar við lágan þrýsting með útsveimsaðferðinni, með útsveimshólfi með 8 cm^3 rúmmáli



1 Tenging við lofttæmi
2 Holur fyrir platínuviðnámshitamæli eða búnað til að mæla og stýra hitastigi (2. heimild)
3 Lok á lofttæmisíláti
4 Hringlaga þétti
5 Lofttæmisílát úr áli
6 Búnaður til að koma útsveimshólfunum fyrir og fjarlægja þau
7 Skrúfað lok
8 Vængjaræ r (6)
9 Boltar (6)
10 Útsveimshólf úr ryðfríu stáli
11 Hitarahylki (6)

Mynd 6a

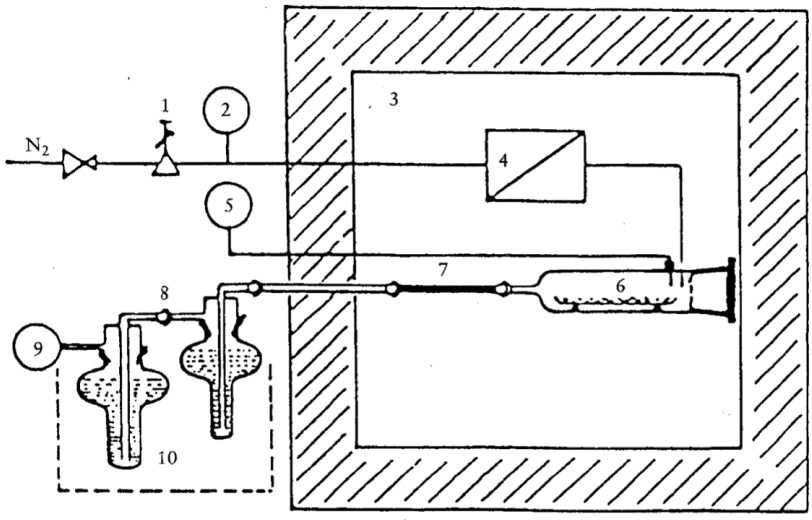
Dæmi um flæðikerfi til ákvörðunar á gufuþrýstingi með gasmettunaraðferðinni



1 = Rennslisstillir
2 = Varmaskiptir
3 = Nálarlokar
4 = Rakanemi
5 = Mettunarsúlur
6 = Samskeyti úr pólýtetraflúoretýleni (PTFE)
7 = Rennslismælir
8 = Ísogsgildra
9 = Olíugildra
10 = Loftbólurör með glerfrittu

Mynd 6b

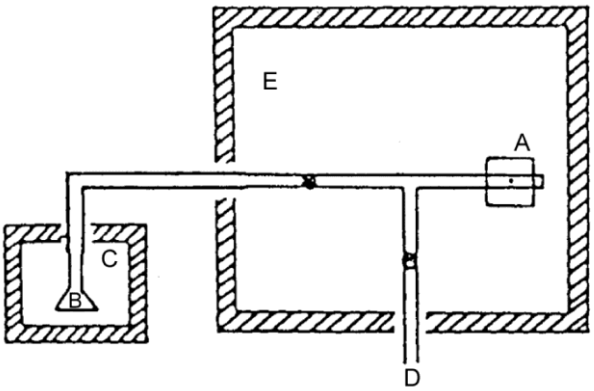
Dæmi um kerfi til ákvörðunar á gufuþrýstingi með gasmettunaraðferðinni með hárpípu sem er staðsett á eftir mettunarhólfinu



1. Varmafræðilegur massarennslismælir
2. Þrýstimælir (e. *manometer*)
3. Hitastýrt hólf
4. Hitastillingarspóla fyrir burðargas
5. Hitamælir (Pt 100)
6. Gasmettunarhólf
7. Hárpípa
8. Ísogsglös
9. Gasmælir
10. Kuldagildra

Mynd 7

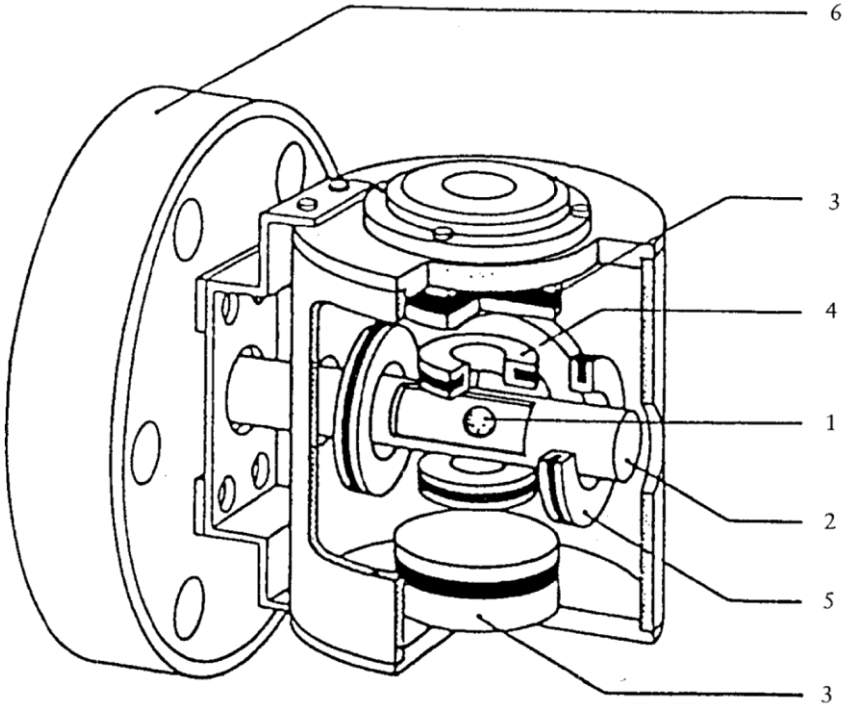
Dæmi um uppsetningu tilraunabúnaðar fyrir snúðaðferðina



Gufuþrýstingsbúnaður
A. mælihaus með snúði
B. sýnishólf
C. hitastillir
D. lofttæmisrás (hverfildæla)
E. lofthitastillir

Mynd 8

Dæmi um mælihaus með snúði



1. Kúla
2. Tæmd, rörlaga framlenging af 6
3. Síseglar (2)
4. Spólur (2) fyrir lóðrétta stöðgun
5. Drifspólur (4)
6. Tengikragi

A.5. YFIRBORÐSSPENNA

1. AÐFERÐ

Aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir (1. heimild). Grundvallarreglurnar eru settar fram í 2. heimild.

1.1. INNGANGUR

Aðferðirnar, sem er lýst, skulu notaðar til að mæla yfirborðsspennu vatnslausna.

Gagnlegt er að afla upplýsinga um vatnsleysni, byggingu og vatnsrofseiginleika efnisins og vendistyrk (e. *critical concentratio*n) fyrir myndun hneppa (e. *micelle*) áður en þessar prófanir eru gerðar.

Eftirfarandi aðferðir má nota fyrir flest íðefni, hvert sem hreinleikastig þeirra er.

Þá aðferð að mæla yfirborðsspennu með yfirborðsspennumæli með hring er aðeins hægt að nota á vatnslausnir með minni skriðseigju en u.þ.b. 200 mPa·s.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Frjálst yfirborðsvermi á flatareiningu yfirborðs er nefnt yfirborðsspenna.

Yfirborðsspennan er gefin sem:

N/m (SI-eining) eða

mN/m (SI-undireining)

1 N/m = 10^3 dýn/cm

1 mN/m = 1 dýn/cm í hinu úrelta cgs-kerfi

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

Viðmiðunarefni, sem ná yfir vítt svið yfirborðsspennu, eru talin upp í 1. og 3. heimild.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐANNA

Aðferðirnar byggjast á mælingum á þeim hámarkskrafti sem beita þarf lóðrétt á ístað eða hring, sem snertir yfirborð vökvasýnis í mæliglasi, til að skilja ístaðið eða hringinn frá yfirborðinu eða sem beita þarf lóðrétt á plötu, þar sem ein brúnin snertir yfirborðið, til að draga upp filmuna sem hefur myndast.

Efni með vatnsleysni, sem er a.m.k 1 mg/l, eru prófuð í vatnslausn við eitt tiltekið styrkgildi.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Meiri nákvæmni fæst með þessum aðferðum en líklegt er að krafist verði við umhverfismat.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐUNUM

Lausn af efninu er útbúin í eimuðu vatni. Styrkur lausnarinnar skal vera 90% af mettunarleysni efnisins í vatni en ef styrkurinn er meiri en 1 g/l er notaður styrkurinn 1 g/l í prófuninni. Ef vatnsleysni efnis er minni en 1 mg/l þarf ekki að prófa það.

1.6.1. **Aðferð með plötu**

Sjá ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Aðferð með ístaði**

Sjá ISO 304 and NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Aðferð með hring**

Sjá ISO 304 og NF T 73-060 (Surface active agents — determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Samhæfð OECD-hringaðferð**

1.6.4.1. *Búnaður*

Yfirborðsspennumælar, sem fást á almennum markaði, duga fyrir þessa mælingu. Þeir samanstanda af eftirfarandi hlutum:

— hreyfanlegu sýnisborði,

— kraftmælikerfi,

— mælistykki (hringur),

— mæliíláti.

1.6.4.1.1. Hreyfanlegt sýnisborð

Hreyfanlega sýnisborðið er notað undir hitastillta mæliílátið með vökvanum sem prófa skal. Því er komið fyrir á standi ásamt kraftmælikerfinu.

1.6.4.1.2. Kraftmælikerfi

Kraftmælikerfið (sjá mynd) er staðsett fyrir ofan sýnisborðið. Skekkja í kraftmælingunni má ekki vera meiri en $\pm 10^{-6}$ N en það samsvarar ± 0,1 mg skekkjumörkum í massamælingu. Í flestum tilvikum er mælikvarði yfirborðsspennumæla, sem fást á almennum markaði, kvarðaður í mN/m þannig að hægt er að lesa yfirborðsspennuna beint af þeim í mN/m með 0,1 mN/m nákvæmni.

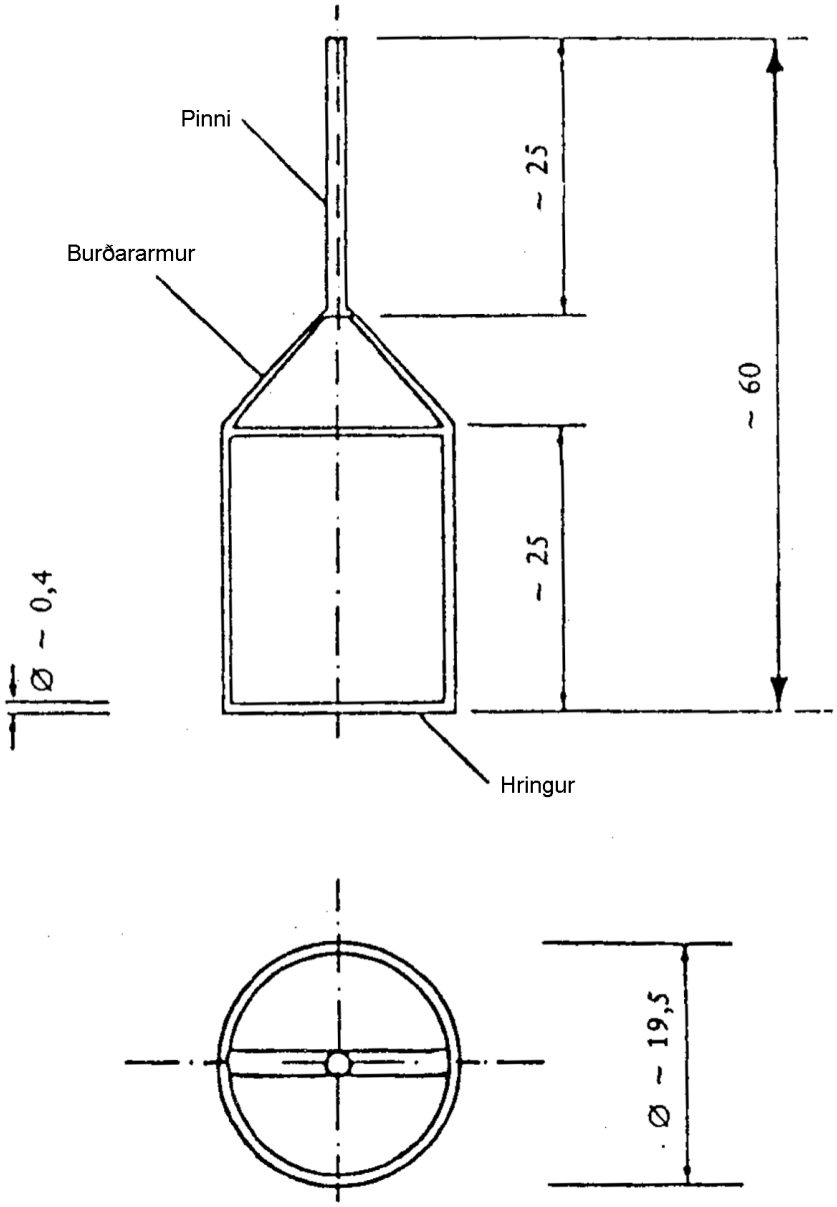
1.6.4.1.3. Mælistykki (hringur)

Hringurinn er venjulega vír úr platínu-iridíum, um 0,4 mm að þykkt og 60 mm að meðalummáli. Vírhringurinn er hengdur lárétt neðan í málmpinna og burðarörmum úr vír til að koma á sambandi við kraftmælikerfið (sjá mynd).

Mynd

Mælistykki

(Öll mál eru í mm)



1.6.4.1.4. Mæliílát

Mæliílátið með prófunarlausninni, sem mæla á, skal vera hitastýrt glerílát. Það skal hannað þannig að hitastig prófunarlausnarinnar og gasfasans yfir yfirborði hennar haldist stöðugt meðan á mælingunni stendur og að sýnið geti ekki gufað upp. Nota má sívöl glerílát með innra þvermáli sem er ekki undir 45 mm.

1.6.4.2. *Undirbúningur búnaðarins*

1.6.4.2.1. Hreinsun

Glerílátin skulu hreinsuð vandlega. Ef þarf skal þvo þau með heitri krómbrennisteinssýru og síðan með seigfljótandi fosfórsýru (83–98% H_3PO_4, miðað við þyngd), skola þau vandlega með kranavatni og þvo þau að lokum með tvíeimuðu vatni þar til hlutlaus svörun fæst en þá skal þurrka ílátin eða hreinsa þau með hluta sýnisvökvans sem mæla á.

Hringinn skal fyrst skola vandlega í vatni til að fjarlægja öll vatnsleysanleg efni, sökkva honum stutta stund í krómbrennisteinssýru, þvo hann með tvíeimuðu vatni þar til hlutlaus svörun fæst og hita hann að lokum stutta stund yfir metanólloga.

Athugasemd:

Verði mengun vegna efna, sem leysast ekki upp eða er eytt með krómbrennisteinssýru eða fosfórsýru, s.s. sílíkon, skulu efnin fjarlægð með heppilegum, lífrænum leysi.

1.6.4.2.2. Kvörðun búnaðarins

Fullgilding búnaðarins felst í því að sannprófa núllpunktinn og stilla vísi tækisins svo að áreiðanleg ákvörðun í mN/m fáist.

Uppsetning:

Búnaðurinn skal réttur af, t.d. með hallamáli á fæti yfirborðsspennumælisins, með því að nota stilli-skrúfurnar á fætinum.

Núllpunktsstilling:

Eftir að hringnum hefur verið komið fyrir á búnaðinum og áður en honum er sökkt í vökvann skal stilla vísi yfirborðsspennumælisins (e. *tensiometer*) á núll og ganga úr skugga um að hringurinn sé samsíða vökvayfirborðinu. Nota má vökvayfirborðið sem spegil í þessu skyni.

Kvörðun:

Hina eiginlegu prófunarkvörðun má framkvæma með tvennu móti:

a) með lóði: í þessu verkferli eru rennilóð með þekktum massa milli 0,1–1,0 g, sett á hringinn. Kvörðunarfastinn Φ_a, sem öll aflestrargildi af tækinu skulu margfölduð með, er ákvarðaður samkvæmt jöfnu (1).

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

þar sem:

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

m = massi rennilóðsins (g)
g = þyngdarhröðun (981 cm s^{-2} við sjávarmál)
b = meðalummál hringsins (cm)
σ_a = lestur af yfirborðsspennumælinum eftir að rennilóðið er sett á hringinn (mN/m).

b) með vatni: í þessu verkferli er notað hreint vatn með yfirborðsspennuna 72,3 mN/m, t.d. við 23 °C. Þetta verkferli er fljótlegra en kvörðun með lóðum en alltaf er hætta á að vottur af mengun vegna yfirborðsvirkra efna leiði til rangrar niðurstöðu um yfirborðsspennu vatnsins.

Kvörðunarfastinn Φ_b, sem öll aflestrargildi af tækinu skulu margfölduð með, er ákvarðaður samkvæmt jöfnu (2):

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

þar sem:

σ_o = gildi sem er tilgreint í heimildum fyrir yfirborðsspennu vatns (mN/m)
σ_g = mælt gildi fyrir yfirborðsspennu vatnsins (mN/m), bæði við sama hitastig.

1.6.4.3. *Undirbúningur sýna*

Útbúa skal vatnslausnir með tilskildum styrkleikum efnisins sem prófa skal og þær mega ekki innihalda nein óuppleyst efni.

Lausninni skal haldið við stöðugt hitastig (± 0,5 °C). Þar eð yfirborðsspenna lausnar í mæliílátinu breytist með tímanum skal gera nokkrar mælingar á mismunandi tímum og teikna línurit sem sýnir yfirborðsspennu sem fall af tíma. Þegar engar frekari breytingar verða hefur jafnvægi verið náð.

Mengun frá ryki eða efnum í loftkenndu formi trufla mælingu. Verkið skal því unnið undir hlíf.

1.6.5. **Prófunarskilyrði**

Mælingin skal gerð við u.þ.b. 20 °C og skal hitastigi haldið innan ± 0,5 °C.

1.6.6. **Framkvæmd prófunar**

Lausnirnar, sem mæla á, skulu fluttar í vandlega hreinsað mæliílátið og þess gætt að ekki myndist froða og síðan skal setja mæliílátið á borð prófunarbúnaðarins. Hækka skal borðið með mæliílátinu þar til hringurinn er kominn á kaf í lausnina, sem mæla á, svo yfir fljóti. Því næst skal lækka borðið jafnt og þétt (u.þ.b. 0,5 cm/mín.) til að skilja hringinn frá yfirborðinu þar til hámarkskrafti er náð. Vökvalagið, sem er fast við hringinn, má ekki losna frá honum. Eftir að mælingunum er lokið skal sökkva hringnum aftur í lausnina svo yfir fljóti og endurtaka mælingarnar þar til stöðugt gildi fæst fyrir yfirborðsspennu. Við hverja ákvörðun skal skrá tímann frá því að lausnin var flutt í mæliílátið. Skrá skal aflestur við þann hámarkskraft sem þarf til að skilja hringinn frá vökvayfirborðinu.

2. **GÖGN**

Til að reikna yfirborðsspennuna skal fyrst margfalda gildið, sem lesið er af tækinu í mN/m, með kvörðunarstuðlinum Φ_a eða Φ_b (eftir því hvaða kvörðunaraðferð er notuð). Þá fæst gildi sem gildir aðeins sem nálgun og þarfnast því leiðréttingar.

Harkins og Jordan (4. heimild) hafa með mælingum ákvarðað leiðréttingarstuðla fyrir yfirborðsspennugildin sem mælast með hringaðferðinni og eru stuðlarnir háðir stærðarmálum hringsins, eðlismassa vökvans og yfirborðsspennu hans.

Þar eð það er mikil vinna að ákvarða leiðréttingarstuðulinn fyrir hverja einstaka mælingu út frá töflum Harkins og Jordans má, við útreikning á yfirborðsspennu vatnslausna, nota það einfaldaða verklag að lesa leiðréttu yfirborðsspennugildin beint af töflunni. (Nota skal innreikning fyrir aflestra sem liggja á milli töflugildana).

Tafla:

Leiðrétting á mældri yfirborðsspennu

Aðeins fyrir vatnslausnir, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (meðalradíus hringsins)
r	= 0,185 mm (radíus vírhringsins)

Tilraunagildi (mN/m)	Leiðrétt gildi (mN/m)	
	Kvörðun með lóðum (sjá a-lið 1.6.4.2.2)	Kvörðun með vatni (sjá b-lið 1.6.4.2.2)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1

Tilraunagildi (mN/m)	Leiðrétt gildi (mN/m)	
	Kvörðun með lóðum (sjá a-lið 1.6.4.2.2)	Kvörðun með vatni (sjá b-lið 1.6.4.2.2)
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	—

Þessi tafla hefur verið tekin saman á grundvelli leiðréttinga samkvæmt Harkins og Jordan. Henni svipar til töflunnar í DIN-staðlinum (DIN 53914) fyrir vatn og vatnslausnir (eðlismassi $\rho = 1\ g/cm^3$) og gildir fyrir hring sem fæst á almennum markaði og er með stærðarmálin R = 9,55 mm (meðalradíus hrings) og r = 0,185 mm (radíus vírhringsins). Í töflunni eru sýnd leiðrétt gildi fyrir mælingar á yfirborðsspennu sem gerðar eru eftir kvörðun með lóðum eða kvörðun með vatni.

Einnig má sleppa kvörðun á undan mælingum og reikna yfirborðsspennuna samkvæmt eftirfarandi formúlu:

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

þar sem:

F = krafturinn sem mælist á aflmæli þegar himnan rofnar

R = radíus hringsins

f = leiðréttingarstuðullinn (1. heimild),

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða aðferð er notuð,

— hvers konar vatn eða lausn er notuð,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— mæliniðurstöður: yfirborðsspenna (aflestur), bæði einstakir aflestrar og meðaltal þeirra sem og leiðrétt meðaltal (þar sem tekið er tillit til tækjastuðulsins og leiðréttingartöflunnar),

— styrkur lausnarinnar,

— prófunarhitastig,

— aldur lausnarinnar sem er notuð, einkum tíminn frá því að lausnin er útbúin og þar til hún er mæld,

— lýsing á tímahæði yfirborðsspennunnar eftir að lausnin hefur verið flutt yfir í mælilátið,

— allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Með tilliti til þess að yfirborðsspenna eimaðs vatns er 72,75 mN/m við 20 °C ber að líta á efni sem yfirborðsvirk efni ef þau sýna minni yfirborðsspennu en 60 mN/m við aðstæðurnar samkvæmt þessari aðferð.

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

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

A.6. **VATNSLEYSNI**

1. **AÐFERÐ**

Aðferðirnar, sem er lýst, byggjast á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir (1. heimild).

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um byggingarformúlu efnisins, gufuþrýsting, klofnunarstuðul og vatnsrof (sem fall af sýrustigi) áður en þessi prófun er gerð.

Engin ein aðferð er fyrir hendi sem nær yfir allt leysnisviðið í vatni.

Prófunaraðferðirnar tvær, sem lýst er hér fyrir aftan, ná yfir allt leysnisviðið en þær er ekki hægt að nota á rokgjörn efni:

— Önnur aðferðin er notuð á efni sem eru í meginatriðum hrein, hafa litla leysni ($< 10^{-2}$ grömm á lítra) og eru stöðug í vatni og kallast hún „súluskolunaraðferðin“.

— Hin aðferðin er notuð á efni sem eru í meginatriðum hrein, hafa meiri leysni ($> 10^{-2}$ grömm á lítra) og eru stöðug í vatni og kallast hún „flöskuaðferðin“.

Óhreinindi geta haft umtalsverð áhrif á vatnsleysni prófunarefnisins.

1.2. SKILGREINING OG EININGAR

Vatnsleysni efnis er skilgreind sem mettunarstyrkur (m.t.t. massa) efnisins í vatni við tiltekið hitastig. Vatnsleysnin er tilgreind í massaeiningum á rúmmál lausnar. SI-einingin er kg/m^3 (einnig má nota grömm á lítra).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Með einfaldri forprófun skal ákvarða nokkurn veginn hversu mikið þarf af sýni og hversu langan tíma þarf til að ná mettunarstyrk (m.t.t. massa).

1.4.1. **Súluskolunaraðferð**

Þessi aðferð byggist á skolun prófunarefnis með vatni úr örsúlu sem inniheldur óvirkt burðarefni, s.s. glerkúlur eða sand, sem hefur verið þakið með umframmagni af prófunarefninu. Vatnsleysnin er ákvörðuð þegar massastyrkur skolvökvans er orðinn stöðugur. Það kemur þannig fram að ferill, sem sýnir styrk sem fall af tíma, verður láréttur.

1.4.2. **Flöskuaðferð**

Í þessari aðferð er efnið (föst efni þarf að dyfta) leyst upp í vatni við hita sem er nokkuð yfir prófunarhitastiginu. Þegar mettun er náð er blandan kæld að prófunarhitastigi og haldið þar meðan hrært er í henni eins lengi og þarf til að ná jafnvægi. Einnig má gera mælinguna beint við prófunarhitastigið ef gengið er úr skugga um, með viðeigandi sýnatöku, að mettunarjafnvægi sé náð. Síðan er massastyrkur efnisins í vatnslausninni, sem má ekki innihalda neinar óuppleystar agnir, ákvarðaður með heppilegri greiningaraðferð.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.5.1. **Endurtekningarnákvæmni**

Með súluskolunaraðferðinni getur verið hægt að ná < 30%, með flöskuaðferðinni ber að ná < 15%.

1.5.2. **Næmi**

Næmið er háð greiningaraðferðinni en unnt er að ákvarða massastyrk allt niður í 10^{-6} grömm á lítra.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Prófunarskilyrði**

Æskilegt er að prófunin sé gerð við 20 ± 0,5 °C. Ef grunur er um að leysnin sé háð hitastigi (> 3% á °C) skal einnig gera prófanir við tvö önnur hitastig sem eru a.m.k. 10 °C yfir og undir upphaflega völdu hitastigi. Í því tilviki skal stýra hitastiginu með ± 0,1 °C nákvæmi. Hitastiginu, sem valið er, skal haldið stöðugu í öllum hlutum búnaðarins sem máli skipta.

1.6.2. **Forprófun**

Út í u.þ.b. 0,1 g af sýni (föst efni skulu vera dyft) í 10 ml kvörðuðu mæliglasi með glertappa er bætt vaxandi magni af eimuðu vatni við stofuhita samkvæmt þrepunum sem eru sýnd í töflunni hér á eftir:

0,1 g efnis sem leysist í „x“ ml af vatni	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Áætluð leysni (grömm á lítra)	> 1 000	1 000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Í hvert sinn sem tilgreindu magni af vatni hefur verið bætt við er blandan hrist kröftuglega í 10 mínútur og skoðað með berum augum hvort eitthvað af sýninu sé óuppleyst. Ef sýnið eða hlutar þess eru enn óuppleystur þegar 10 ml af vatni hefur verið bætt við skal tilraunin endurtekin í 100 ml mæliglasi með auknu vatnsmagni. Sé leysnin lítil getur þurft talsvert lengri tíma til að leysa efnið upp (bíða skal a.m.k. 24 klst.). Áætluð leysni er gefin upp í töflunni fyrir neðan það magn af viðbættu vatni sem þarf til að sýnið leysist alveg upp. Ef efnið virðist enn óleysanlegt skal bíða lengur en 24 klst. (þó lengst 96 klst.) eða þynna lausnina frekar til að ganga úr skugga um hvort nota skuli súluskolunaraðferðina eða flöskuaðferðina.

1.6.3. **Súluskolunaraðferð**

1.6.3.1. *Burðarefni, leysir og skiljuvökvi*

Burðarefnið fyrir súluskolunaraðferðina skal vera óvirkt. Meðal efna, sem nota má, eru glerkúlur og sandur. Nota skal hentugan, rokgjarnan leysi af greiningargæðum til að flytja prófunarefnið yfir á burðarefnið. Sem skiljuvökva skal nota vatn sem hefur verið tvíeimað í gler- eða kvarstæki.

Athugasemd:

Ekki má nota vatn beint frá lífrænum jónaskipti.

1.6.3.2. *Hleðsla á burðarefnið*

Vegin eru u.þ.b. 600 mg af burðarefni og sett í 50 ml flösku með kúptum botni.

Hæfilegt, vegið magn af prófunarefni er leyst upp í leysinum sem valinn hefur verið. Viðeigandi magni af þessari lausn er bætt við burðarefnið. Leysirinn skal látinn gufa algerlega upp, t.d. í hverfieimi, þar eð annars næst ekki að vatnsmetta burðarefnið vegna skiptingaráhrifa (e. *partition effect*) á yfirborði þess.

Flutningur yfir á burðarefnið getur valdið vandkvæðum (röngum niðurstöðum) ef prófunarefnið er flutt sem olía eða sem annar kristalsfasi. Vandamálið skal rannsaka með tilraunum og greina ítarlega frá niðurstöðunum.

Meðhöndlaða burðarefnið er látið liggja í bleyti í u.þ.b. 5 ml af vatni í um tvær klukkustundir en síðan er svifblöndunni hellt í örsúluna. Einnig má hella þurru, meðhöndluðu burðarefni í örsúluna, sem hefur verið fyllt með vatni, og leyfa því að standa í um tvær klukkustundir til að ná jafnvægi.

Prófunarferli

Efnið má skola úr burðarefninu með annarri af tveimur mismunandi aðferðum:

— með hringrásardælu (sjá mynd 1).

— með forðaflösku (sjá mynd 4).

1.6.3.3. *Súluskolunaraðferð með hringrásardælu*

Búnaður

Uppdráttur af uppsetningu á dæmigerðu kerfi er sýndur á mynd 1. Hentug örsúla er sýnd á mynd 2 en hvaða stærð sem er getur gengið, að því tilskildu að hún uppfylli viðmiðanir um samanburðarnákvæmni og næmi. Í súlunni skal vera kollrúm sem rúmar a.m.k. fimm beðrúmtök af vatni og hún skal geta rúmað a.m.k. fimm sýni. Einnig má nota minni súlu ef bætt er í leysi sem kemur í stað fyrstu fimm beðrúmtakanna sem eru fjarlægð með óhreinindunum.

Súluna skal tengja við hringrásardælu sem getur stýrt u.þ.b. 25 ml rennsli á klst. Dælan er tengd með tengingum úr pólýtetraflúoretýleni og/eða gleri. Þegar súlan og dælan hafa verið tengdar skal vera unnt að taka sýni af skolvökvanum og jafna kollrúmið við loftþrýsting. Súluefninu er haldið uppi með litlum (5 mm) tappa úr glerull sem einnig gegnir því hlutverki að sía frá agnir. Hringrásardælan getur t.d. verið slöngudæla eða himnudæla (þess skal gætt að engin mengun verði af efninu í slöngunni né/eða ásog á það).

Mælingar

Komið er af stað streymi í gegnum súluna. Mælt er með því að rennslishraðinn sé u.þ.b. 25 ml/klst. (en það svarar til 10 beðrúmtaka/klst. fyrir súluna sem hér er lýst). Fyrstu fimm beðrúmtökunum (að lágmarki) er hent til að fjarlægja vatnsleysanleg óhreinindi. Eftir það er hringrásardælan látin ganga uns jafnvægi er náð en svo telst vera þegar tilviljanakennd breyting á styrkleikum fimm sýna í röð er ekki meiri en ± 30%. Þessi sýni skulu vera aðskilin hvert frá öðru með millibilum sem samsvara gegnumstreymistíma a.m.k. 10 beðrúmtaka af skiljuvökvanum.

1.6.3.4. *Súluskolunaraðferð með forðaflösku*

Búnaður (sjá myndir 4 og 3)

Forðaflaska (e. *levelling vessel*): til að koma á tengingu við forðaflöskuna er notað slíptengi (e. *ground glass joint*) sem er tengt við slöngu úr pólýtetraflúoretýleni (PTFE) Mælt er með því að rennslishraðinn sé hafður u.þ.b. 25 ml/klst. Hlutasýni af skolvökva (e. *eluate fraction*) eru tekin eitt af öðru og greind með aðferðinni sem hefur verið valin.

Mælingar

Hlutasýni, tekin um miðbik afskolunarinnar þar sem styrkleikar eru stöðugir (± 30%) í a.m.k. fimm sýnum sem eru tekin hvert á eftir öðru, eru notuð til að ákvarða leysni í vatni.

Í báðum tilvikum (þegar notuð er hringrásardæla eða forðaflaska) er framkvæmd önnur prófunarkeyrsla með helmingi minni rennslishraða en í þeirri fyrri. Ef niðurstöður úr þessum tveimur prófunarkeyrslum eru samhljóða er prófunin fullnægjandi en ef fram kemur meiri leysni við minni rennslishraðann verður að halda áfram að helminga rennslishraðann þar til tvær prófanir í röð gefa sömu leysnina.

Í báðum tilvikum (þegar notuð er hringrásardæla eða forðaflaska) skal kanna hvort í sýnunum greinast svifagnir með því að prófa fyrir Tyndall-áhrifum (ljósdreifingu). Ef slíkar agnir er að finna ógildir það niðurstöðurnar og endurtaka verður prófunina eftir að síunargeta súlunnar hefur verið aukin.

Skrá skal sýrustig hvers sýnis. Framkvæma skal aðra keyrslu við sama hitastig.

1.6.4. **Flöskuaðferð**

1.6.4.1. *Búnaður*

Fyrir flöskuaðferðina þarf eftirfarandi hluti:

— venjulega glermuni og tækjabúnað rannsóknarstofu,

— tæki til að hrista lausnirnar við stýrð, stöðug hitastig,

— skilvindu (helst hitastillta) fyrir ýrulausnir, ef þörf er á, og — búnað til magngreiningar

1.6.4.2. *Mælingar*

Metið er með forprófun hversu mikið af efni þarf til að metta tiltekið rúmmál vatns. Vatnsmagnið, sem til þarf, er háð greiningaraðferð og leysnisviði. Um fimm sinnum meira af efni en ákvarðað var hér að framan er vegið í hvert þriggja gleríláta sem eru með glertappa (t.d. skilvinduglös eða flöskur). Vatnsmagninu, sem valið hefur verið, er bætt í hvert ílát og þeim lokað þétt með tappa. Lokuðu ílátin eru síðan hrist við 30 °C. (Nota skal hristi- eða hræribúnað sem getur unnið við stöðugt hitastig, t.d. segulhrærslu í hitastilltu vatnsbaði). Eftir einn dag er eitt ílátið tekið, látið standa í 24 klukkustundir við prófunarhitastigið til að ná aftur jafnvægi og hrist af og til. Innihald ílátsins er síðan sett í skilvindu við prófunarhitastigið og styrkur prófunarefnisins í tærum vatnsfasanum er ákvarðaður með viðeigandi greiningaraðferð. Hinar flöskurnar tvær fá sömu meðhöndlun eftir að þær hafa verið látnar standa við 30 °C til að jafnvægi náist, önnur í tvo daga, hin í þrjá. Prófunin telst fullnægjandi ef styrkniðurstöður úr a.m.k. síðustu tveimur ílátunum eru í samræmi við tilskilda samanburðarnákvæmni. Endurtaka skal prófunina í heild með lengri biðtíma til að ná fram jafnvægi ef niðurstöðurnar úr 1.–3. íláti sýna tilhneigingu í átt að hækkandi gildum.

Mælingarnar má einnig gera án þess að láta flöskurnar fyrst standa við 30 °C. Til að meta hversu hratt mettunarjafnvægi kemst á eru tekin sýni þar til það hefur ekki lengur áhrif á styrk prófunarlausnarinnar hversu lengi er hrært.

Skrá skal sýrustig hvers sýnis.

1.6.5. **Greining**

Æskilegt er að notuð sé efnasértæk greiningaraðferð til þessara ákvarðana þar eð lítið magn uppleysanlegra óhreininda getur valdið miklum skekkjum í mældri leysni. Dæmi um slíkar aðferðir eru gas- og vökvaskiljun, títrunaraðferðir, ljósmælingaraðferðir og aðferðir til spennustraumsmælinga.

2. **GÖGN**

2.1. SÚLUSKOLUNARAÐFERÐ

Fyrir hverja keyrslu ætti að reikna út meðalgildi og staðalfrávik a.m.k. fimm sýna sem eru tekin hvert á eftir öðru þegar mettunarstyrkur hefur náð jafnvægi. Niðurstöðurnar skal setja fram sem massaeiningar á rúmmál lausnar.

Borið er saman meðaltal tveggja prófana með mismunandi rennslishraða og skal endurtekningarnákvæmni vera undir 30%.

2.2. FLÖSKUAÐFERÐ

Tilgreina skal niðurstöður fyrir flöskurnar þrjár, hverja um sig, og reikna meðaltal af þeim niðurstöðum sem taldar eru stöðugar (endurtekningarnákvæmni undir 15%) og tilgreina þær í massaeiningum á rúmmál lausnar. Þetta kann að útheimta endurreikning á massaeiningum yfir í rúmmálseiningar með því að nota eðlismassa þegar leysnin er mjög mikil (> 100 grömm í lítra).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. SÚLUSKOLUNARAÐFERÐ

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— niðurstöður forprófunar,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— styrkgildi, rennslishraði og sýrustig fyrir hvert sýni,

— meðaltöl og staðalfrávik a.m.k. fimm sýna í hverri keyrslu sem eru tekin þegar mettunarstyrkurinn hefur náð jafnvægi,

— meðaltal tveggja viðunandi keyrslna í röð,

— hitastig vatnsins meðan á mettunarferlinu stendur,

— greiningaraðferðin sem er notuð,

— tegund burðarefnis sem er notað,

— hleðsla á burðarefnið,

— hvaða leysir er notaður,

— vísbendingar um hvers kyns efnafræðilegan óstöðugleika efnisins meðan á prófun stendur og aðferðin sem er notuð,

— allar upplýsingar sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

3.2. FLÖSKUAÐFERÐ

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— niðurstöður forprófunar,

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— niðurstöður hverrar magngreiningar, ásamt meðaltali hafi fleiri en eitt gildi verið ákvarðað fyrir hverja flösku,

— sýrustig hvers sýnis,

— meðalgildi fyrir þær flöskur sem sýndu sams konar gildi,

— prófunarhitastigið,

— greiningaraðferðin sem var notuð,

— vísbendingar um hvers kyns efnafræðilegan óstöðugleika efnisins meðan á prófun stendur og aðferðin sem er notuð,

— allar upplýsingar sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

4. **HEIMILDIR**

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

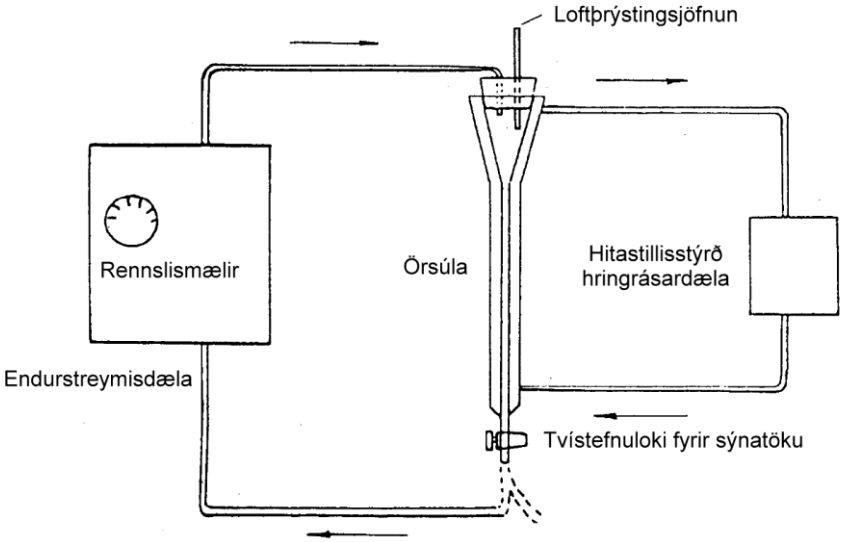
2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 85) Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

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

Viðbætir

Mynd 1

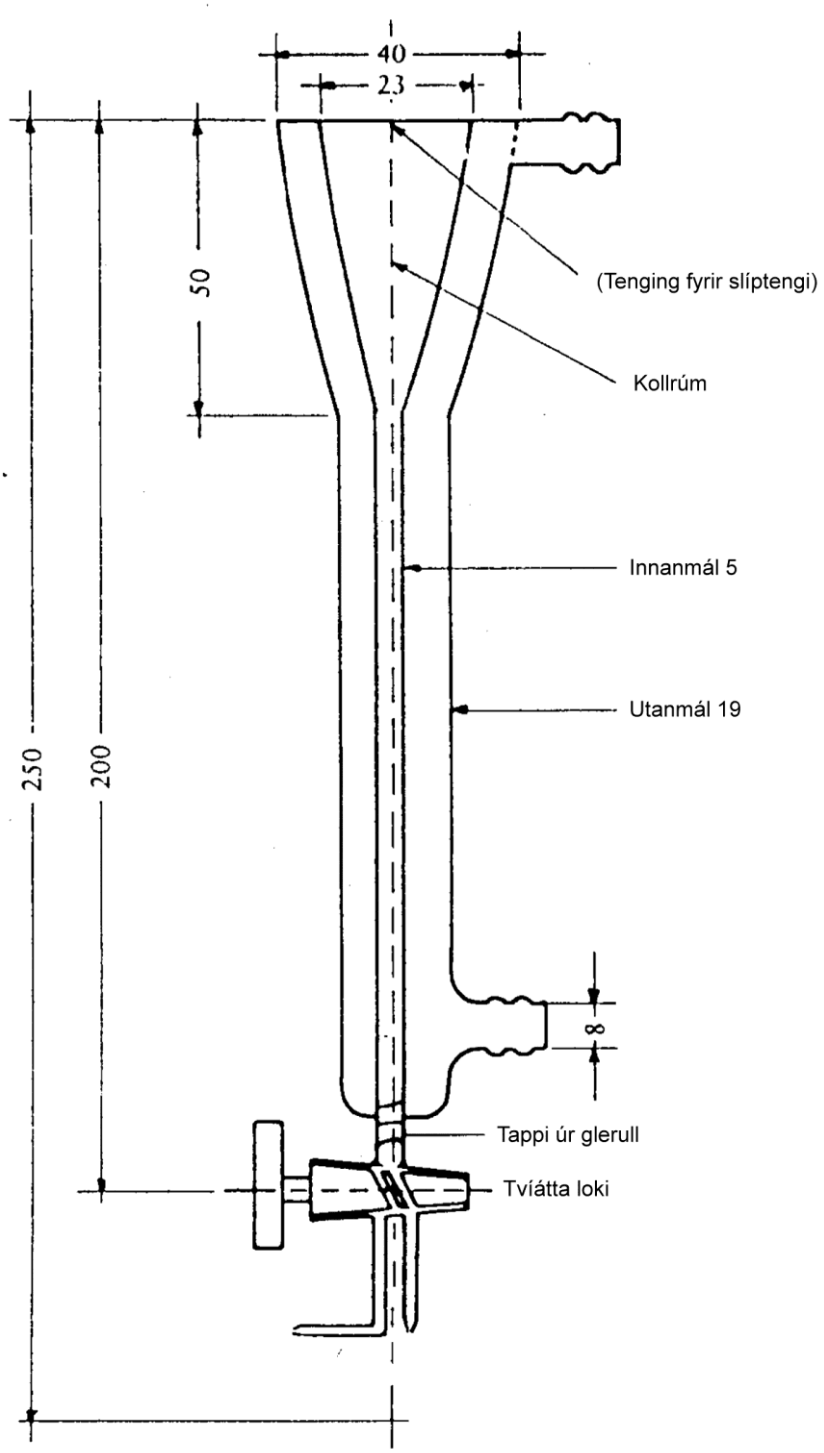
Súluskolunaraðferð með hringrásardælu



Mynd 2

Dæmigerð örsúla

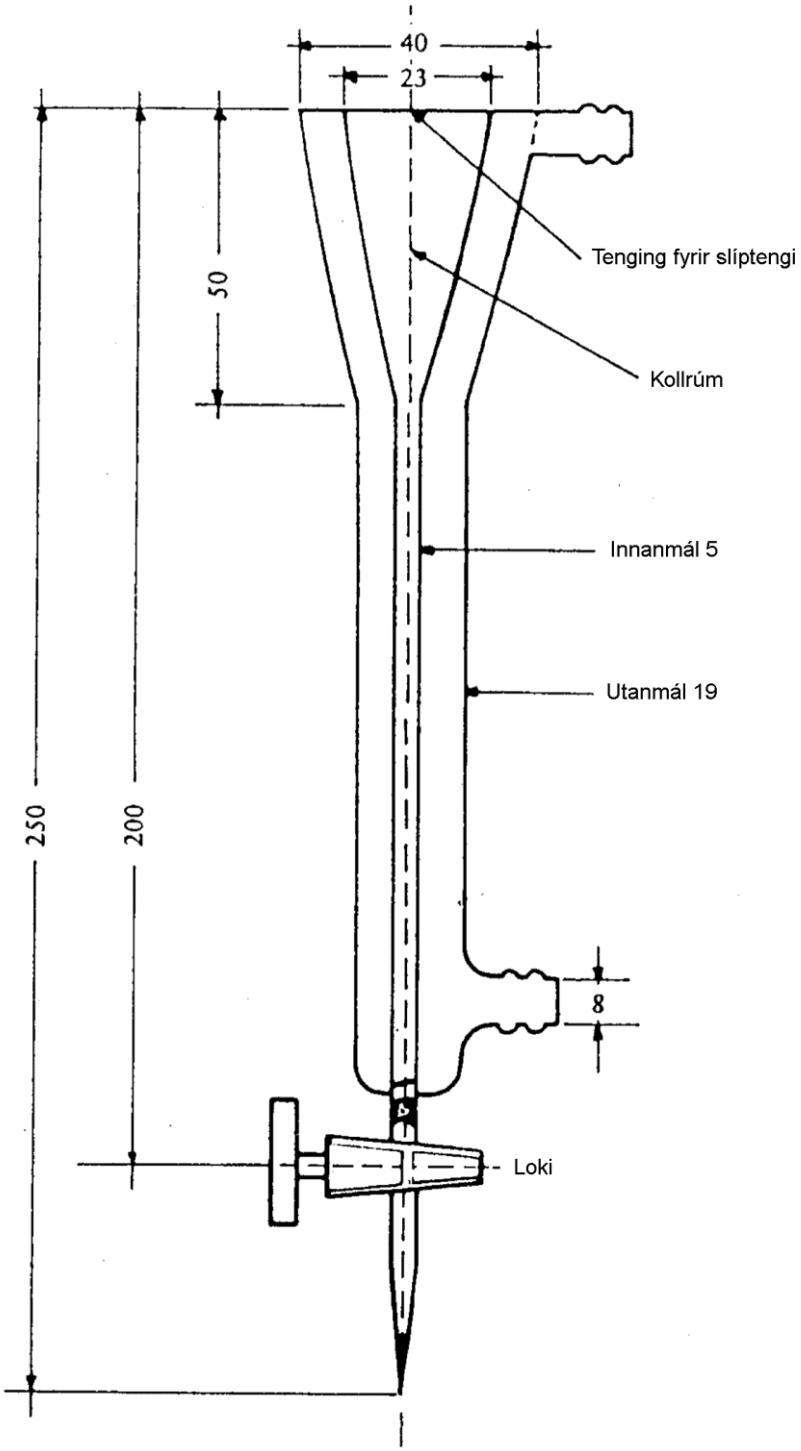
(Öll mál eru í mm)



Mynd 3

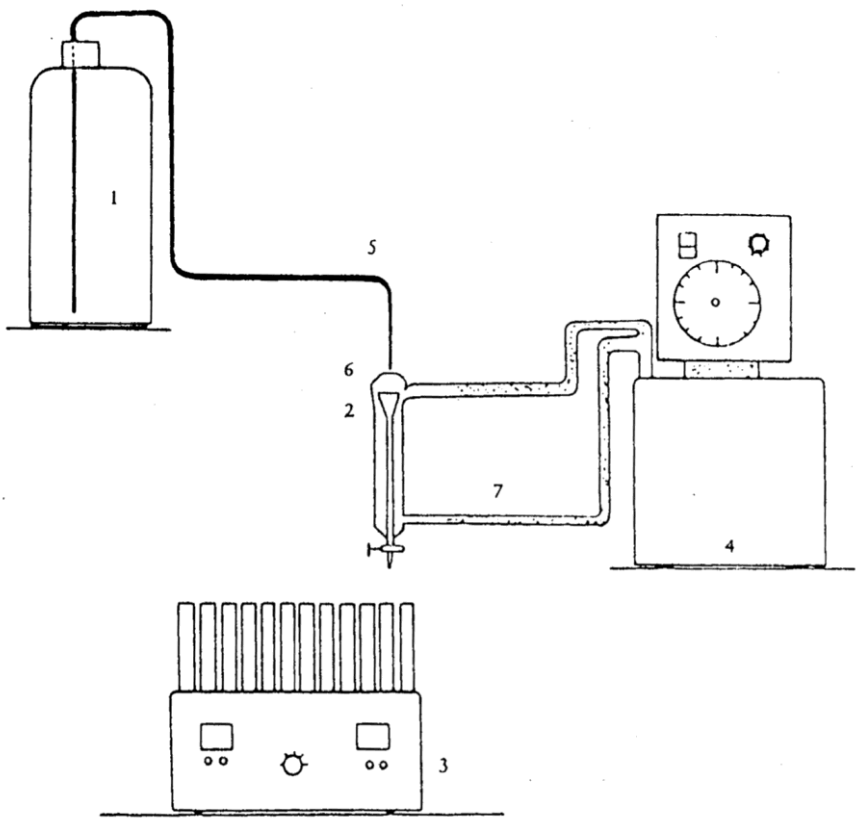
Dæmigerð örsúla

(Öll mál eru í mm)



Mynd 4

Súluskolunaraðferð með forðaflösku



1 = Forðaflaska (t.d. 2,5 lítra flaska)
2 = Súla (sjá mynd 3)
3 = Skammtasafnari
4 = Hitastillir
5 = Teflonslanga
6 = Slíptengi
7 = Vatnslagnir (milli hitastillis og súlu, innra þvermál u.þ.b. 8 mm)

A.8. **DEILISTUÐULL**

1. **AÐFERÐ**

Hristiflöskuaðferðin (e. *shake-flask method*), sem er lýst, byggist á OECD-viðmiðunarreglu um prófanir (1. heimild).

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um byggingarformúlu efnisins, klofnunarstuðul, vatnsleysni, vatnsrof, leysni í n-oktanóli og yfirborðsspennu áður en þessi prófun er gerð.

Þegar mæld eru efni sem geta jónast skulu þau ávallt vera í ójónuðu formi (óbundin sýra eða óbundinn basi) með því að nota viðeigandi jafnalausn með pH-gildi sem er a.m.k. einu pH-stigi undir (óbundin sýra) eða yfir (óbundinn basi) pK-gildinu.

Þessi prófunaraðferð felur í sér tvenns konar verkferli: hristiflöskuaðferðina og háþrýstivökvaskiljun (HPLC). Fyrra verklagið hentar þegar log P_{ow}-gildið (sjá skilgreiningar hér að aftan) er á bilinu – 2 til 4 og það seinna þegar gildið er á bilinu 0–6. Áður en prófað er með öðru hvoru tilraunaferlanna er rétt að áætla fyrst deilistuðulinn.

Hristiflöskuaðferðin hentar aðeins fyrir efni sem eru að mestu leyti hrein og leysanleg í vatni og n-oktanóli. Hún hentar ekki fyrir yfirborðsvirk efni (þegar um slík efni er að ræða skal leggja fram reiknað gildi eða matsgildi sem er byggt á leysni annars vegar í n-oktanóli og hins vegar í vatni).

Háþrýstivökvaskiljun hentar ekki fyrir sterkar sýrur og basa, málmflóka, yfirborðsvirk efni eða efni sem hvarfast við skiljuvökvann. Þegar um slík efni er að ræða skal leggja fram reiknað gildi eða matsgildi sem er byggt á leysni annars vegar í n-oktanóli og hins vegar í vatni.

Háþrýstivökvaskiljun er ekki eins næm fyrir óhreinindum í prófunarefnasambandinu og hristiflöskuaðferðin. Engu að síður geta óhreinindi stundum torveldað túlkun niðurstaðna vegna þess að ákvörðun toppgilda verður óviss. Þegar um er að ræða blöndur, sem gefa óaðgreinanlega toppa, skal tilgreina efri og neðri mörk fyrir log P.

1.2. SKILGREINING OG EININGAR

Deilistuðullinn (P) er skilgreindur sem hlutfall jafnvægisstyrkleika (c_i) uppleysts efnis í tveggja fasa kerfi sem samanstendur af tveimur leysum sem eru að mestu óblandanlegir. Þegar notað er n-oktanól og vatn:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-octanol}}{c_{water}}$$

Deilistuðullinn (P) er því hlutfallið milli tveggja styrkleika og er venjulega gefinn upp sem tugalogri (log P).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Hristiflöskuaðferðin

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

Háþrýstivökvaskiljun

Til að tengja mæligögn úr háþrýstivökvaskiljun efnasambands við P-gildi þess verður að setja upp kvörðunargraf með log P á móti skiljugögnum með a.m.k. sex viðmiðunarpunktum. Notandi velur viðeigandi viðmiðunarefni. Þegar því verður við komið skal minnst eitt viðmiðunarefnasambandanna hafa hærra P_{ow}-gildi en prófunarefnið og minnst eitt P_{ow}-gildi sem er lægra en prófunarefnisins. Þegar gildið á log P er lægra en 4 má byggja kvörðunina á gögnum sem fást með hristiflöskuaðferðinni. Þegar gildið á log P gildi er hærra en 4 má byggja kvörðunina á viðurkenndum gildum úr heimildum ef þau eru í samræmi við reiknuð gildi. Til að auka nákvæmnina er æskilegt að velja viðmiðunarefnasambönd sem eru byggingarlega skyld prófunarefninu.

Fáanlegir eru yfirgripsmiklar skrár með log P_{ow}-gildum fyrir marga efnaflokka (2.–3. heimild). Séu gögn um deilistuðla byggingarlega skyldra efnasambanda ekki fáanleg má notast við almennari kvörðun sem fengin er með öðrum viðmiðunarefnasamböndum.

Í 2. viðbæti er skrá yfir ráðlögð viðmiðunarefni og P_{ow}-gildi þeirra.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

1.4.1. **Hristiflöskuaðferðin**

Til að hægt sé að ákvarða deilistuðul verður að nást jafnvægi milli allra víxlverkandi efnisþátta kerfisins og ákvarða styrkleika efnanna sem eru uppleyst í fösunum tveimur. Athugun á heimildum um þetta viðfangsefni sýnir að til að leysa það má nota nokkrar mismunandi aðferðir, þ.e. að blanda fösunum tveimur rækilega saman og skilja þá síðan að til að unnt sé að ákvarða jafnvægisstyrk efnisins sem verið er að rannsaka.

1.4.2. **Háþrýstivökvaskiljun**

Í háþrýstivökvaskiljun eru notaðar greiningarsúlur sem í er þjappað efni í föstum fasa sem fæst á almennum markaði og inniheldur langar vetniskolefniskeðjur (t.d. C_8, C_{18}) sem eru bundnar kísli með efnatengjum. Íðefni, sem eru sett í slíka súlu, ferðast eftir henni á mismunandi hraða vegna mismunandi skiptingar á milli ferðafasans og stöðufasans úr vetniskolefnum. Blöndur íðefna eru skolaðar út í samræmi við vatnsfælni þeirra, vatnsleysanleg efni fyrst og olíuleysanleg íðefni síðast, í hlutfalli við deilistuðul þeirra milli vetniskolefna og vatns. Á þann hátt má ákvarða sambandið milli rástíma í slíkri súlu (óskautaður stöðufasi) og deilistuðulsins fyrir n-oktanól/vatn. Deilistuðullinn er leiddur af rýmdarstuðlinum k en hann fæst með stæðunni:

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

þar sem t_r er rástími prófunarefnisins og t_o er sá meðaltími sem það tekur leysissameind að komast í gegnum súluna (súlutími).

Megindlegar greiningaraðferðir eru óþarfar og er eingöngu nauðsynlegt að ákvarða skoltíma.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.5.1. **Endurtekningarnákvæmni**

Hristiflöskuaðferðin

Til að tryggja nákvæmni deilistuðulsins skulu ákvarðanir tvíteknar við þrenns konar mismunandi prófunaraðstæður og má breyta bæði tilgreindu efnismagni sem og rúmmálshlutfalli milli leysiefna. Ákvörðuð gildi deilistuðulsins, gefin upp sem tugalograr, skulu liggja á bili sem svarar til ± 0,3 lograeininga.

Háþrýstivökvaskiljun

Til þess að auka áreiðanleika mælinganna skulu ákvarðanir tvíteknar. Gildi á log P úr einstökum mælingum skulu liggja á bili sem svarar til ± 0,1 lograeininga.

1.5.2. **Næmi**

Hristiflöskuaðferðin

Mælisvið aðferðarinnar ræðst af greiningarmörkum greiningarferlisins. Því ætti að vera unnt að meta gildi log P_{ow} á bilinu – 2 til 4 (við tilteknar aðstæður má lengja þetta bil upp í 5) þegar styrkur uppleysta efnisins í öðrum hvorum fasanum er ekki meiri en 0,01 mól í lítra.

Háþrýstivökvaskiljun

Háþrýstivökvaskiljunin gerir það kleift að meta deilistuðul fyrir log P_{ow}-gildi á bilinu 0–6.

Venjulega er hægt að meta deilistuðul efnasambands svo ekki víki meira en ± l lograeiningu frá gildinu sem fæst með hristiflöskuaðferðinni. Dæmigerða fylgni má sjá í heimildum (4.–8. heimild). Að jafnaði er unnt að ná meiri nákvæmni þegar fylgnilínurit eru byggð á byggingarlega skyldum viðmiðunarefnasamböndum (9. heimild).

1.5.3. **Sértæki**

Hristiflöskuaðferðin

Deililögmál Nernst gildir aðeins um þynntar lausnir við stöðugt hitastig, þrýsting og sýrustig. Strangt til tekið gildir það aðeins um hreint efni sem dreifist á tvo hreina leysa. Ef fleiri en eitt uppleyst efni koma samtímis fyrir í öðrum fasanum eða báðum getur það haft áhrif á niðurstöðurnar.

Klofnun eða tenging uppleystu sameindanna leiðir til frávika frá deililögmáli Nernst. Slík frávik koma þannig fram að deilistuðullinn verður háður styrk lausnarinnar.

Þar eð hér er um að ræða margþætt jafnvægi skal ekki nota þessa prófunaraðferð á efnasambönd sem geta jónast nema beitt sé leiðréttingum. Meta þarf hvort nota skuli jafnalausn í stað vatns fyrir slík efnasambönd og skal þá munurinn á pH-gildi jafnans og pKa-gildi efnisins vera a.m.k. 1 pH-eining og huga verður að áhrifum þessa pH-gildis á umhverfið.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Bráðabirgðamat á deilistuðlinum**

Æskilegt er að deilistuðullinn sé metinn með reikniaðferð (sjá 1. viðbæti) en, þegar við á, út frá hlutfallinu milli leysni prófunarefnisins í hreinu leysunum (10. heimild).

1.6.2. **Hristiflöskuaðferðin**

1.6.2.1. *Undirbúningur*

n-Oktanól: ákvörðun á deilistuðli skal framkvæma með mjög greiningarhreinu hvarfefni.

Vatn: nota skal vatn sem hefur verið eimað eða tvíeimað í gler- eða kvarsbúnaði. Þegar um er að ræða efnasambönd sem geta jónast skal nota jafnalausnir í stað vatns ef ástæða er til.

Athugasemd:

Ekki skal nota vatn sem tekið er beint úr jónaskipti.

1.6.2.1.1. Formettun leysanna

Áður en deilistuðull er ákvarðaður eru fasar leysakerfisins mettaðir hvor með öðrum með því að hrista þá saman við prófunarhitastigið. Í þessu skyni er hentugt að hrista tvær stórar birgðaflöskur með n-oktanóli eða vatni af greiningarhreinleika, hvora um sig með nægilegu magni af hinum leysinum, í 24 klst. í vélhristara og láta þær síðan standa nægilega lengi til að fasarnir skiljist og mettun náist.

1.6.2.1.2. Undirbúningur prófunar

Samanlagt rúmmál tveggja fasa kerfisins á næstum að fylla prófunarílátið. Þannig er dregið úr hættu á að efni fari forgörðum vegna uppgufunar. Rúmmálshlutfallið og efnismagn eru ákveðin í samræmi við eftirfarandi atriði:

— bráðabirgðamat á deilistuðlinum (sjá hér að framan),

— lágmarksmagn prófunarefnis sem þarf fyrir greiningarferlið og

— takmörkun á hámarksstyrk í hvorum fasanum við 0,01 mól í lítra.

Gerðar eru þrjár prófanir. Í þeirri fyrstu er notast við reiknað rúmmálshlutfall n-oktanóls og vatns, í annarri er deilt í þetta hlutfall með tveimur og í hinni þriðju er þetta hlutfall margfaldað með tveimur (þ.e. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Prófunarefni

Útbúin er stofnlausn í n-oktanóli sem er formettað með vatni. Ákvarða skal styrk þessarar stofnlausnar nákvæmlega áður en hún er notuð við ákvörðun á deilistuðli. Lausnina skal geyma við þannig aðstæður að tryggt sé að hún haldist stöðug.

1.6.2.2. *Prófunarskilyrði*

Halda skal prófunarhitastiginu stöðugu (± 1 °C) og skal það vera á bilinu 20–25 °C.

1.6.2.3. *Mælingar*

1.6.2.3.1. Deilijafnvægi náð

Útbúa skal tvö eins prófunarílát fyrir hverjar prófunaraðstæður með því nákvæmlega mælda magni sem til þarf af leysunum tveimur ásamt nauðsynlegu magni af stofnlausn.

n-oktanól fasana skal mæla eftir rúmmáli. Prófunarílátin eru annaðhvort sett í hentugan hristara eða hrist með handafli. Þegar notað er skilvinduglas er ráðlegt að snúa því snöggt 180° um þverás þess svo að allt innilokað loft stígi upp í gegnum báða fasana. Reynslan hefur sýnt að 50 slíkir snúningar nægja venjulega til þess að deilijafnvægi náist. Til öryggis er ráðlegt að hafa snúningana 100 á fimm mínútum.

1.6.2.3.2. Fasaskiljun

Ef það er nauðsynlegt er blandan þeytt í skilvindu til að skilja fasana að. Það skal gera með rannsóknar-stofuskilvindu sem haldið er við stofuhita en ef notuð er skilvinda sem er ekki er hitastillt skal láta skilvinduglösin standa við prófunarhitastigið í a.m.k. eina klukkustund fyrir greininguna til þess að jafnvægi náist.

1.6.2.4. *Greining*

Til að ákvarða deilistuðulinn er nauðsynlegt að ákvarða styrkleika prófunarefnisins í báðum fösum. Þetta má gera með því að taka deiliskammt af hvorum fasa úr hverju glasi fyrir hverjar prófunaraðstæður og greina þá samkvæmt því verkferli sem hefur verið valið. Reikna skal heildarefnismagn í báðum fösum og bera saman við það efnismagn sem upphaflega var sett í.

Taka skal sýni úr vatnsfasanum á þann hátt að sem minnst hætta sé á því að n-oktanól í snefilmagni fylgi með: hægt er að nota glersprautu með lausri nál til að taka sýni úr vatnsfasanum. Fyrst er sprautan fyllt að hluta með lofti. Því er síðan þrýst varlega út meðan nálinni er stungið í gegnum n-oktanól-lagið. Hæfilegt magn af vatnsfasanum er dregið upp í sprautuna. Sprautan er tekin fljótt úr lausninni og nálin tekin af. Innihald sprautunnar má síðan nota sem vatnssýnið. Æskilegt er að styrkurinn í aðskildu fösunum tveimur sé ákvarðaður með efnasértækri aðferð. Dæmi um greiningaraðferðir sem geta átt við eru:

— ljósmælingaraðferðir,

— gasgreining,

— háþrýstivökvaskiljun.

1.6.3. **Háþrýstivökvaskiljun**

1.6.3.1. *Undirbúningur*

Búnaður

Nota þarf vökvaskilju með sláttarlausri dælu og hentugum skynjarabúnaði. Ráðlegt er með að nota inngjafarloka með inngjafarlykkjum. Ef skautaðir hópar eru í stöðufasanum getur það rýrt mjög afkastagetu háþrýstivökvaskiljunarsúlunnar. Þess vegna skal hlutfall skautaðra hópa í stöðufasanum vera sem lægst (11. heimild). Nota má öragna pökkunarefni með öfugum fasa eða tilbúnar, pakkaðar súlur sem fást á almennum markaði. Setja má forsúlu á milli inngjafarkerfisins og greiningarsúlunnar.

Ferðafasi:

Notað er metanól og vatn með hreinleika fyrir háþrýstivökvaskiljun til að útbúa skolleysinn sem er afgasaður fyrir notkun. Við skolun skal nota fastan ferðafasa. Í metanól-vatnsblöndunni skulu að lágmarki vera 25% af vatni. Venjulega er fullnægjandi að nota blöndu af metanóli og vatni í rúmmálshlutföllunum 3:1 til að skola efnasambönd með log P 6 út á innan við klukkustund við rennslishraðann 1 ml/mín. Þegar um er að ræða efnasambönd með hátt log P-gildi getur verið nauðsynlegt að stytta skoltímann (einnig fyrir viðmiðunarefnasamböndin) með því að minnka skautun ferðafasans eða nota styttri súlu.

Þegar leysni efna í n-oktanóli er mjög lítil verður log P_{ow}-gildið gjarna óeðlilega lágt með háþrýstivökvaskiljun og fylgja toppar slíkra efnasambanda stundum leysijaðrinum. Þetta stafar trúlega af því að deiliferlið er of hægvirkt til að jafnvægi náist á þeim tíma sem aðskilnaður með háþrýstivökvaskiljun tekur venjulega. Til að fá áreiðanlegt gildi getur þá verið árangursríkt að minnka rennslishraðann og/eða lækka metanól-vatnshlutfallið.

Prófunar- og viðmiðunarefnasambönd skulu vera leysanleg í ferðafasanum í nægum styrkleikum til að unnt sé að greina þau. Íblöndunarefni má aðeins í undantekningartilvikum setja í metanól-vatnsblönduna þar eð íblöndunarefni breyta eiginleikum súlunnar. Fyrir skiljurit með íblöndunarefnum ber ávallt að nota sérstaka súlu af sömu gerð. Ef blanda af metanóli og vatni hentar ekki má nota aðrar blöndur af lífrænum leysum og vatni, t.d. etanól og vatn eða asetónítríl og vatn.

Þegar um er að ræða efnasambönd sem geta jónast er pH-gildi skiljuvökvans er afar mikilvægt. Það skal vera innan pH-vinnusviðs súlunnar, þ.e. að jafnaði milli 2–8. Ráðlegt er að nota jöfnun. Fara skal varlega til að komast hjá saltútfellingum og skemmdum á súlunni sem geta orðið þegar notaðar eru tilteknar blöndur af lífrænum fösum og jafnalausnum. Ekki er ráðlegt að gera mælingar með háþrýstivökvaskiljun með stöðufösum úr kísli við hærra pH-gildi en 8 þar eð basískur ferðafasi getur dregið hratt úr afkastagetu súlunnar.

Uppleyst efni

Viðmiðunarefnasamböndin skulu vera eins hrein og unnt er. Efnasambönd, sem nota skal við prófun eða kvörðun, eru leyst upp í ferðafasanum ef þess er kostur.

Prófunarskilyrði

Hitastig má ekki sveiflast meira en ± 2 K meðan á mælingum stendur.

1.6.3.2. **Mæling**

Útreikningur á súlutíma, t_o

Hægt er að ákvarða súlutímann t_o með því að nota annaðhvort raðkvæmaröð (e. *homologous series*) (t.d. n-alkýlmetýlketón) eða lífræn efnasambönd sem ekki sitja eftir (t.d. þíóúreu eða formamíð). Þegar reikna skal súlutímann t_o með raðkvæmaröð eru a.m.k. sjö efni úr raðkvæmaröð sett á súluna og rástímar viðkomandi efna ákvarðaðir. Hráir rástímarnir, $t_{r(nc\ +\ 1)}$, eru teiknaðir inn sem fall af $t_{r(nc)}$, og skurðpunkturinn a og hallinn b úr aðhvarfsjöfnunni:

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

eru ákvarðaðir (n_c = fjöldi kolefnisatóma). Súlutíminn t_o er þá gefinn með:

$$t_o = a/(1 - b)$$

Kvörðunargraf

Næsta skref er að teikna fylgnilínurit með log k-gildum á móti log p fyrir viðeigandi viðmiðunarefnasambönd. Í framkvæmd er þetta gert þannig að 5–10 stöðluðum viðmiðunarefnasamböndum með log p-gildi á bilinu sem búist er við er sprautað samtímis í og rástímarnir ákvarðaðir, helst með tegrunarrita sem er tengdur skynjarakerfinu. Samsvarandi lograr af rýmdarstuðlunum log k eru reiknaðir og teiknaðir sem fall af því log p-gildi sem ákvarðað var með hristiflöskuaðferðinni. Kvarðað er með reglulegu millibili, a.m.k. daglega, svo tekið sé tillit til hugsanlegra breytinga á afköstum súlunnar.

Ákvörðun á rýmdarstuðli prófunarefnisins

Prófunarefninu er sprautað inn í eins litlu magni af ferðafasa og unnt er. Rástíminn er ákvarðaður (tvisvar) en út frá honum má reikna rýmdarstuðulinn k. Deilistuðul prófunarefnisins má innreikna út frá fylgnigrafi viðmiðunarefnasambandanna. Ef deilistuðullinn er mjög lágur eða mjög hár er nauðsynlegt að framreikna. Í þeim tilvikum þarf að gæta sérstaklega að öryggismörkum aðhvarfslínunnar.

2. **GÖGN**

Hristiflöskuaðferðin

Prófa má áreiðanleika ákvarðaðra P-gilda með því að bera saman meðaltöl endurteknu ákvarðananna við heildarmeðaltalið.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— ef ekki reynist unnt að nota aðferðirnar (t.d. ef efnið er yfirborðsvirkt) skal leggja fram reiknað gildi eða mat sem er byggt á einstökum gildum fyrir leysni í n-oktanóli og vatni,

— allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi og eðlisástand efnisins.

Fyrir hristiflöskuaðferðina:

— niðurstöður bráðabirgðamats, ef um slíkt er að ræða,

— hitastig við ákvörðunina,

— gögn um þau greiningarferli sem voru notuð til að ákvarða styrkleika,

— tími í skilvindu og hraði hennar, ef hún er notuð,

— mældir styrkleikar í báðum fösum fyrir hverja ákvörðun (þetta þýðir að greint er frá samtals 12 styrkleikum),

— þyngd prófunarefnisins, rúmmál hvers fasa sem notaður er í hvert prófunarílát og reiknað heildarmagn prófunarefnis sem er í hverjum fasa eftir að jafnvægi er náð,

— reiknuð gildi deilistuðulsins (P) og meðaltalið fyrir hverjar prófunaraðstæður um sig sem og meðaltalið fyrir allar ákvarðanir. Ef vísbending er um að deilistuðullinn sé háður styrk skal greina frá því í skýrslunni;

— skýra skal frá staðalfráviki einstakra P-gilda frá meðaltali þeirra,

— meðaltal af P allra ákvarðana skal einnig gefið upp í formi logra (með grunntöluna 10),

— reiknað, fræðilegt P_{ow}-gildi þegar það gildi hefur verið ákvarðað eða þegar mælda gildið er > 10^4,

— sýrustig vatnsins, sem er notað, og vatnsfasans í tilrauninni,

— rökstuðningur fyrir notkun jafna í stað vatns, ef jafnar eru notaðir, samsetning, styrkur og sýrustig jafnalausnanna og sýrustig vatnsfasans fyrir og eftir tilraunina.

Fyrir háþrýstivökvaskiljun:

— niðurstöður bráðabirgðamats, ef um slíkt er að ræða,

— prófunar- og viðmiðunarefni og hreinleiki þeirra,

— hitasviðið sem ákvarðanirnar eru gerðar á,

— sýrustigið sem ákvarðanirnar eru gerðar við,

— ítarlegar upplýsingar um greiningarsúlu og forsúlu, ferðafasa og greiniaðferðir,

— mæligildi rástíma og log P-gildi úr heimildum fyrir viðmiðunarefnasamböndin sem notuð eru til kvörðunar,

— upplýsingar um bestu aðhvarfslínu (log k á móti log P),

— meðalmæligildi rástíma og innreiknað log P-gildi fyrir prófunarefnasambandið,

— lýsing á búnaði og prófunarskilyrðum,

— skolunarrit (e. *elution profile*),

— magn prófunar- og viðmiðunarefna sem sett eru á súluna,

— súlutími og hvernig hann var mældur.

4. **HEIMILDIR**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Base1, 1978.

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

1. viðbætir

Aðferðir við útreikning/mat

INNGANGUR

Almennan inngang að reikniaðferðum ásamt gögnum og dæmum er að finna í *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (heimild (a)).

Nota má reiknuð P_{ow}-gildi:

— til að ákveða hvor tilraunaaðferðin henti (svið hristiflöskuaðferðar: log P_{ow} – 2 til 4, svið háþrýstivökvaskiljunar: log P_{ow}: 0–6),

— til að velja viðeigandi prófunarskilyrði (t.d. viðmiðunarefni fyrir háþrýstivökvaskiljun og rúmmálshlutfall milli n-oktanóls og vatns fyrir hristiflöskuaðferðina),

— til innra eftirlits á rannsóknarstofu með hugsanlegum skekkjum í tilraunum,

— til að áætla P_{ow} þegar ekki er unnt að nota tilraunaaðferðirnar af tæknilegum ástæðum.

MATSAÐFERÐ

Bráðabirgðamat á deilistuðlinum

Gildi deilistuðuls má meta með því að notast við leysni prófunarefnisins í leysunum óblönduðum. Þá er notuð jafnan:

$$P_{mat} = \frac{\text{mettun } c_{\text{n-oktanól}}}{\text{mettun } c_{\text{vatn}}}$$

REIKNIAÐFERÐIR

Meginreglan að baki reikniaðferðunum

Reikniaðferðirnar byggjast allar á formlegu uppbroti sameindarinnar í heppilega byggingarhluta sem hafa þekkt og áreiðanleg log P_{ow}-gildi. Log P_{ow}-gildið fyrir alla sameindina er síðan reiknað út sem summan af tilheyrandi sameindarbrotsgildum að viðbættri summu leiðréttingarliðanna fyrir víxlverkanir innan sameindar.

Skrár yfir sameindarbrotsfasta og leiðréttingarliði eru tiltækar (heimildir (b), (c), (d) og (e)). Sumar þeirra eru uppfærðar reglulega (heimild (b)).

Gæðaviðmiðanir

Almennt minnkar áreiðanleiki reikniaðferðarinnar eftir því sem efnasambandið, sem verið er að rannsaka, er flóknara. Þegar um er að ræða einfaldar sameindir með litla sameindaþyngd og einn eða tvo virka hópa má gera ráð fyrir fráviki, sem nemur 0,1–0,3 log P_{ow}-einingum, milli niðurstaðna úr mismunandi uppbrotsaðferðum og mælds gildis fyrir log P_{ow}. Þegar sameindirnar eru flóknari geta skekkjumörkin verið stærri. Það er háð því hversu áreiðanlegir sameindarbrotsfastarnir eru og hvort þeir eru tiltækir og hvort borin eru kennsl á víxlverkanir í sameindunum (t.d. vetnistengi) og leiðréttingarliðirnir notaðir rétt (tölvuforritið CLOGP-3 leysir þennan vanda að nokkru leyti) (heimild (b)). Þegar um er að ræða efnasambönd sem geta jónast er mikilvægt að taka viðhlítandi tillit til hleðslu eða umfangs jónunar.

Reikniaðferð

π-aðferð Hansch

Upprunalegi fastinn fyrir vatnsfælna sethópa, π, sem Fujira o.fl. settu fram (heimild (f)), er skilgreindur sem hér segir:

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

þar sem P_{ow} (PhX) er deilistuðull arómatískrar afleiðu og P_{ow} (PhH) deilistuðull móðurefnasambandsins

(t.d. $\pi_{Cl} = \log P_{ow}\,(C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\,(C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Samkvæmt skilgreiningu á π-aðferðinni hentar hún aðallega fyrir arómatísk skiptihvörf. π-gildi fyrir mikinn fjölda sethópa hafa verið sett upp í töflur (heimild (b), (c) og (d)). Þessi gildi eru notuð til að reikna log P_{ow} fyrir arómatískar sameindir eða byggingarhluta.

Aðferð Rekkers

Samkvæmt Rekker (heimild (g)) er log P_{ow}-gildið reiknað á eftirfarandi hátt:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j \quad \text{(víxlverkunarliðir)}$$

þar sem f_i stendur fyrir mismunandi sameindarbrotsfasta og a_i er tíðni þeirra í sameindinni sem er til rannsóknar. Leiðréttingarliðina má rita sem heilt margfeldi af aðeins einum fasta, C_m (svokölluðum töfrafasta (e. *magic constant*). Sameindarbrotsfastarnir f_i og C_m voru ákvarðaðir eftir skrá yfir 1054 P_{ow}-gildi úr tilraunum (825 efnasambönd) þar sem notuð var greining með margbreytuaðhvarfi (e. *multiple regression analysis*) (heimildir (c) og (h)). Víxlverkunarliðirnir eru ákvarðaðir í samræmi við tilteknar reglur sem lýst er í heimildum (e), (h) og (i).

Aðferð Hansch-Leo

Samkvæmt Hansch og Leo (heimild (c)) er log P_{ow}-gildið reiknað út frá:

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

þar sem f_i stendur fyrir sameindarbrotsfasta, F_j fyrir leiðréttingarliðina og a_i, b_j fyrir tilheyrandi tíðni. Með endurteknum prófunum var, á grundvelli P_{ow}-gilda úr tilraunum, gerð skrá yfir gildi fyrir sameindarbrot frumeinda og hópa og skrá yfir leiðréttingarliði, F_j (svokallaða stuðla). Leiðréttingarliðunum hefur verið raðað í nokkra mismunandi flokka (heimildir (a) og (c)). Það er hlutfallslega flókið og tímafrekt að taka tillit til allra reglna og leiðréttingarliða. Hugbúnaðarpakkar hafa verið þróaðir (heimild (b)).

Samsett aðferð

Unnt er að bæta mjög útreikning á log P_{ow}-gildum fyrir flóknar sameindir ef sameindinni er skipt í stærri byggingarhluta með áreiðanleg log P_{ow}-gildi, annaðhvort gildi sem eru tekin úr töflum (heimildir (b) og (c)) eða gildi úr eigin mælingum. Slík brot (t.d. heturhringasambönd, antrakínón, asóbensen) er síðan hægt að leggja saman með π-gildum Hansch eða með sameindarbrotsföstum Rekkers eða Leos.

Athugasemdir

i. Reikniaðferðirnar er aðeins hægt að nota á efnasambönd sem eru jónuð að einhverju eða öllu leyti ef unnt er að taka nauðsynlega leiðréttingarstuðla með í reikninginn.

ii. Ef gera má ráð fyrir vetnistengjum innan sameinda þarf að bæta við samsvarandi leiðréttingarliðum (u.þ.b. +0,6 til +1,0 log P_{ow}-einingum) (heimild (a)). Þrívíddarlíkön af sameindinni eða niðurstöður litrófsgreininga á henni geta gefið vísbendingar um að slík tengi sé þar að finna.

iii. Ef mismunandi ráphverfur koma til greina skal nota líklegustu myndina sem grundvöll útreiknings.

iv. Fylgjast skal vel með endurskoðunum á skrám yfir sameindarbrotsfastana.

Skýrsla

Ef notaðar eru reikni- eða matsaðferðir skulu eftirtaldar upplýsingar vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— lýsing á efninu (blanda, óhreinindi o.s.frv.),

— vísbendingar um öll hugsanleg vetnistengi í sameindinni, klofnun, hleðslu og öll önnur óvenjuleg áhrif (t.d. ráphverfi),

— lýsing á reikniaðferðinni,

— auðkenni gagnasafns eða uppruni,

— sérkenni í vali sameindarbrota,

— tæmandi greinargerð fyrir útreikningum.

HEIMILDIR

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

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

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

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

e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14, bls. 479.

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

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

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

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

2. viðbætir

Ráðlögð viðmiðunarefni fyrir háþrýstivökvaskiljun

Nr.	Viðmiðunarefni	log P_{ow}	pKa
1	2-bútanón	0,3	
2	4 asetýlpýridín	0,5	
3	anilín	0,9	
4	asetanilíð	1,0	
5	bensýlalkóhól	1,1	
6	p-metoxýfenól	1,3	pKa = 10,26
7	fenoxýediksýra	1,4	pKa = 3,12
8	fenól	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-dínítrófenól	1,5	pKa = 3,96
10	bensónítríl	1,6	
11	fenýlasetónítríl	1,6	
12	4-metýlbensýlalkóhól	1,6	
13	asetófenón	1,7	
14	2- nítrófenól	1,8	pKa = 7,17
15	3-nítróbensósýra	1,8	pKa = 3,47
16	4-klóranilín	1,8	pKa = 4,15
17	nítróbensen	1,9	
18	sinnamínalkóhól	1,9	
19	bensósýra	1,9	pKa = 4,19
20	p-kresól	1,9	pKa = 10,17
21	sinnamínsýra	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anísól	2,1	
23	metýlbensóat	2,1	
24	bensen	2,1	
25	3-metýlbensósýra	2,4	pKa = 4,27
26	4-klórfenól	2,4	pKa = 9,1
27	tríklóretýlen	2,4	
28	atrasín	2,6	
29	etýlbensóat	2,6	
30	2,6-díklórbensónítríl	2,6	
31	3-klórbensósýra	2,7	pKa = 3,82
32	tólúen	2,7	
33	1-naftól	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-díklóranilín	2,8	
35	klórbensen	2,8	
36	allýlfenýleter	2,9	
37	brómbensen	3,0	
38	etýlbensen	3,2	
39	bensófenón	3,2	
40	4-fenýlfenól	3,2	pKa = 9,54
41	þýmól	3,3	

Nr.	Viðmiðunarefni	log P_{ow}	pKa
42	1,4-díklórbensen	3,4	
43	difenýlamín	3,4	pKa = 0,79
44	naftalín	3,6	
45	fenýlbensóat	3,6	
46	ísóprópýlbensen	3,7	
47	2,4,6-tríklórfenól	3,7	pKa = 6
48	bífenýl	4,0	
49	bensýlbensóat	4,0	
50	2,4-dínítró-6-sek-bútýlfenól	4,1	
51	1,2,4-tríklórbensen	4,2	
52	dódekansýra	4,2	
53	difenýleter	4,2	
54	n-bútýlbensen	4,5	
55	fenantren	4,5	
56	flúoranten	4,7	
57	díbensýl	4,8	
58	2,6-difenýlpýridín	4,9	
59	trífenýlamín	5,7	
60	DDT (díklórdífenýltríklóretan)	6,2	
	Önnur viðmiðunarefni með lágt log P_{ow}-gildi		
1	nikótínsýra	-0,07	

A.9. **BLOSSAMARK**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um eldfimi efnisins áður en þessi prófun er gerð. Prófunarferlið hentar á fljótandi efni ef unnt er að kveikja í gufu þeirra með kveikjugjöfum. Prófunaraðferðirnar, sem lýst er í þessum texta, eru aðeins áreiðanlegar fyrir þau blossamarkssvið sem eru tilgreind fyrir hverja aðferð um sig.

Við val á aðferð skal taka tillit til hugsanlegra efnahvarfa milli efnisins og sýnisílátsins.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Blossamark er lægsta hitastigið, leiðrétt að 101,325 kPa þrýstingi, þar sem vökvi, við þær aðstæður sem eru skilgreindar í prófunaraðferðinni, myndar gufur í slíku magni að eldfim blanda gufu og lofts myndast í prófunarílátinu.

Einingar: °C

$T = t – 273,15$

(t í °C og T í K)

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Slík efni ber fyrst og fremst að nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Efnið er sett í prófunarílátið og hitað eða kælt að prófunarhitastigi samkvæmt því verkferli sem er lýst í viðkomandi prófunaraðferð. Gerðar eru íkveikjutilraunir til að komast að því hvort það kviknar í sýninu við prófunarhitastigið.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.5.1. **Endurtekningarnákvæmni**

Endurtekningarnákvæmnin er breytileg eftir blossamarkssviðinu og prófunaraðferðinni sem er notuð: að hámarki 2 °C.

1.5.2. **Næmi**

Næmið er háð prófunaraðferðinni sem er notuð.

1.5.3. **Sértæki**

Sértæki sumra prófunaraðferða takmarkast við tiltekin blossamarkssvið og ræðst af öðrum efniseiginleikum (t.d. mikilli seigju).

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Sýni af prófunarefninu er sett í prófunarbúnað skv. 1.6.3.1 og/eða 1.6.3.2.

Af öryggisástæðum er ráðlegt að beita aðferð með litlu sýni, u.þ.b. 2 cm^3, á orkurík eða eitruð efni.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

Ef öryggisaðstæður leyfa skal koma búnaðinum fyrir þar sem ekki er dragsúgur.

1.6.3. **Framkvæmd prófunarinnar**

1.6.3.1. *Jafnvægisaðferð*

Sjá ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Ójafnvægisaðferð*

Abel-búnaður:

Sjá 170. hluta BS 2000, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky-búnaður:

Sjá EN 57, 1. hluta DIN 51755 (fyrir hitastig frá 5–65 °C), 2. hluta DIN 51755 (fyrir lægri hita en 5 °C), NF M07-036.

Tag-búnaður:

Sjá ASTM D 56

Pensky-Martens-búnaður:

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

Athugasemdir:

Þegar blossamark, sem er ákvarðað með ójafnvægisaðferð skv. 1.6.3.2, reynist vera 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C eða 55 ± 2 °C skal staðfesta það með jafnvægisaðferð og sama búnaði.

Þegar skila þarf tilkynningu má aðeins nota aðferðir sem geta gefið hitastig blossamarksins.

Til að ákvarða blossamark seigfljótandi vökva (málningar, líms og þess háttar) sem innihalda leysa má aðeins nota búnað og prófunaraðferðir sem henta til að ákvarða blossamark seigfljótandi vökva.

Sjá ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, 1. hluta DIN 53213.

2. **GÖGN**

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— tilgreina skal aðferðina sem er notuð og einnig öll hugsanleg frávik,

— niðurstöður og allar aðrar athugasemdir sem máli skipta við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

Engar.

A.10. **ELDFIMI (FÖST EFNI)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um hugsanlega sprengifimi efnisins áður en þessi prófun er gerð.

Þessa prófun skal aðeins nota á duftkennd, kornótt eða deigkennd efni.

Til að ekki séu tekin með öll efni sem hægt er að kveikja í heldur eingöngu þau sem brenna hratt eða brenna á sérstaklega hættulegan hátt eru eingöngu þau efni, þar sem brunahraði er yfir tilteknum mörkum, talin mjög eldfim.

Bruni getur verið sérstaklega hættulegur þegar glóandi (e. *incandescence*) nær að breiðast út í málmdufti vegna þess að erfitt er að slökkva eld í því. Málmduft, sem glóandi breiðist út í, telst mjög eldfimt.

1.2. SKILGREINING OG EININGAR

Brunatími er tilgreindur í sekúndum.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki tilgreind.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Efnið er lagt í óslitna lengju af dufti, um 250 mm að lengd, og ákvarðað í forskimunarprófun hvort bruni breiðist um efnið með loga eða glóð eftir að kveikt hefur verið í með gasloga. Nái bruninn að breiðast meira en 200 mm eftir lengjunni á tilteknum tíma er gerð heildarprófun til að ákvarða brunahraðann.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ekki tilgreindar.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐ

1.6.1. **Forskimunarprófun**

Efnið er lagt í óslitna lengju af dufti, um 250 mm að lengd, 20 mm að breidd og 10 mm á hæð, á eldtraustri, ógropinni plötu með litla varmaleiðni. Heitur logi frá gasbrennara (a.m.k. 5 mm að þvermáli) er borinn að öðrum enda duftlengjunnar uns kviknar í duftinu, þó eigi lengur en tvær mínútur (fimm mínútur ef um er að ræða málmduft eða málmblendiduft). Skrá skal hvort bruninn breiðist 200 mm eftir lengjunni á 4 mínútna löngum prófunartíma (eða 40 mínútna löngum þegar um málmduft er að ræða). Ef ekki kviknar í efninu og bruni breiðist hvorki um það með loga né glóð 200 mm eftir duftlengjunni á 4 mínútna (eða 40 mínútna) prófunartíma telst efnið ekki mjög eldfimt og frekari prófanir eru óþarfar. Ef bruni í efninu breiðist 200 mm eftir duftlengjunni á skemmri tíma en fjórum mínútum, eða 40 mínútum þegar um málmduft er að ræða, skal framkvæma verkferlið sem lýst er hér á eftir (liður 1.6.2. og áfram).

1.6.2. **Prófun á brunahraða**

1.6.2.1. *Undirbúningur*

Duftkennd eða kornótt efni eru sett óþjöppuð í 250 mm langt mót með þríhyrndu þversniði sem er 10 mm hátt og 20 mm breitt að innra máli. Á báðar langhliðar mótsins er fest málmplata sem gegnir hlutverki hliðarskorðu og skagar 2 mm upp yfir efri brún þríhyrnda þversniðsins (mynd). Mótið er síðan látið falla þrisvar úr 2 cm hæð á fastan flöt. Ef þörf krefur er mótið fyllt aftur. Því næst eru hliðarskorðurnar

fjarlægðar og umframefni skafið burt. Eldtraust, ógropin botnplata með lítilli varmaleiðni er sett ofan á mótið, búnaðinum hvolft og mótið fjarlægt.

Deigkenndum efnum er smurt í 250 mm snærislaga lengju, sem er um 1 cm^2 að þversniði, á eldtrausta, ógropna botnplötu með lítilli varmaleiðni.

1.6.2.2. *Prófunarskilyrði*

Ef efnið er næmt fyrir raka skal gera prófunina eins hratt og unnt er eftir að efnið hefur verið tekið úr ílátinu.

1.6.2.3. *Framkvæmd prófunarinnar*

Efnislengjunni er komið fyrir í súgskápi þvert á loftstrauminn.

Lofthraðinn skal vera nægilega mikill til að gufur komist ekki út í rannsóknarstofuna og honum skal ekki breyta meðan á prófun stendur. Setja skal dragsúgshlíf í kringum búnaðinn.

Heitur logi frá gasbrennara (a.m.k. 5 mm að þvermáli) er notaður til að kveikja í öðrum enda lengjunnar. Þegar 80 mm af lengjunni hafa brunnið er brunahraðinn næstu 100 mm mældur.

Prófað er sex sinnum, hverju sinni með hreinni, kaldri plötu, nema jákvæð niðurstaða fáist fyrr.

2. **GÖGN**

Brunatíminn samkvæmt forskimunarprófuninni (1.6.1) og stysti brunatíminn í allt að sex prófunum (1.6.2.3) skipta máli fyrir matið.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— lýsing á efninu, sem prófa skal, og eðlisástand þess, þ.m.t. rakainnihald,

— niðurstöður úr forskimunarprófun og úr brunahraðaprófun, ef hún fer fram,

— allar aðrar athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Duftkennd, kornótt eða deigkennd efni teljast mjög eldfim ef brunatími í prófun, sem gerð er í samræmi við prófunarferlið sem lýst er í 1.6.2, er styttri en 45 sekúndur. Málmduft eða málmblendiduft telst mjög eldfimt ef unnt er að kveikja í því og loginn eða hvarfsvæðið breiðist um allt sýnið á 10 mínútum eða skemmri tíma.

4. **HEIMILDIR**

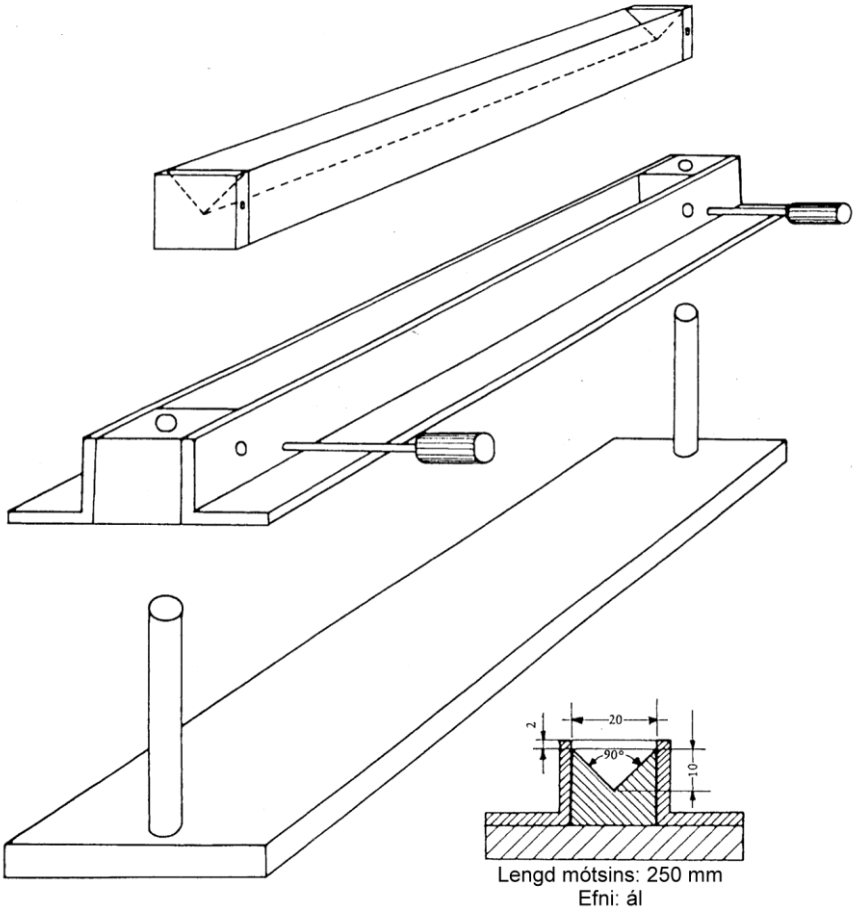
NF T 20-042 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

Viðbætir

Mynd

Mót og fylgihlutir til að útbúa lengjuna

(Öll mál eru í mm)



A.11. **ELDFIMI (LOFTTEGUNDIR)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Með þessari aðferð má ákvarða hvort lofttegundir, sem eru blandaðar lofti við stofuhita (u.þ.b. 20 °C) og loftþrýsting, eru eldfimar og þá á hvaða styrkleikasviði. Rafmagnsneisti er borinn að blöndum með prófunarlofttegundinni í síauknum styrkleikum í lofti og fylgst með hvort í þeim kviknar.

1.2. SKILGREINING OG EININGAR

Eldfimisvið er styrkleikasviðið milli neðri og efri sprengimarka. Neðri og efri sprengimörk eru þau styrkmörk eldfimrar lofttegundar í loftblöndu þar sem logi breiðist ekki út.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki tilgreind.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Styrkur lofttegundarinnar í lofti er aukinn stig af stigi og blandan látin komast í snertingu við rafmagnsneista á hverju stigi.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ekki tilgreindar.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Prófunarílátið er uppréttur glersívalningur sem er a.m.k. 50 mm að innra þvermáli og a.m.k. 300 mm á hæð. Kveikirafskautin eru höfð í 3–5 mm fjarlægt hvort frá öðru og 60 mm yfir botni sívalningsins. Hólkurinn er með opi til að hleypa út þrýstingi. Skerma þarf búnaðinn af til að draga úr skaða vegna hugsanlegrar sprengingar.

Til íkveikju er notaður fastur spanneisti sem varir í 0,5 sek. og er myndaður með háspennuspenni með 10–15 kV útgangsspennu (hámarksaflinntak 300 W). Í 2. heimild er lýsing á heppilegum tækjabúnaði.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

Prófunina skal gera við stofuhita (u.þ.b. 20 °C).

1.6.3. **Framkvæmd prófunarinnar**

Blanda af gasi og lofti í þekktum styrk er dælt í glersívalninginn með skammtadælu. Neisti er leiddur í gegnum blönduna og athugað hvort logi skilst frá neistagjafanum og breiðist út sjálfkrafa. Styrk lofttegundarinnar er breytt í þrepum með 1% rúmmálsbili uns kviknar í eins og áður er lýst.

Ef efnafræðileg bygging lofttegundarinnar bendir til þess að hún sé ekki eldfim og unnt er að reikna út hlutfallasamsetningu blöndunnar við loft þá þarf aðeins að prófa í 1% þrepum þær blöndur sem eru á bilinu 10% undir til 10% yfir efnahlutföllunum í blöndunni.

2. **GÖGN**

Einu upplýsingarnar, sem máli skipta við ákvörðun á þessum eiginleika, er hvort logi nær að breiðast út.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— lýsing, ásamt stærðarmálum, á búnaðinum sem notaður var,

— hitastigið sem prófað var við,

— styrkleikarnir, sem voru prófaðir, og niðurstöður úr þeim prófunum,

— niðurstaða prófunarinnar: óeldfim lofttegund eða mjög eldfimt lofttegund,

— ef niðurstaðan er sú að lofttegundin sé ekki eldfim skal tilgreina á hvaða styrkleikasviði hún var prófuð í 1% þrepum,

— allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

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

2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann "Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen". Chem.-Ing.- Tech. 1984, vo1. 56, 2, 126-127. , T. Redeker und H. Schacke, bls. 126-127.

A.12. **ELDFIMI (Í SNERTINGU VIÐ VATN)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Þessa prófunaraðferð má nota til að ákvarða hvort efnahvarf efnis við vatn eða rakt loft leiðir til myndunar á hættulegu magni af einni eða fleiri lofttegundum sem geta verið mjög eldfimar.

Prófunaraðferðina má nota bæði á föst og fljótandi efni. Þessi aðferð hentar ekki fyrir efni sem kviknar sjálfkrafa í þegar þau komast í snertingu við andrúmsloft.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Mjög eldfimt: efni sem í snertingu við vatn eða rakt loft mynda mjög eldfimar lofttegundir í hættulegu magni, minnst 1 lítra/kg á klukkustund

1.3. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Efnið er prófað samkvæmt þreparöðinni sem lýst er hér á eftir en kvikni í á einhverju þrepinu eru frekari prófanir óþarfar. Sé vitað að efnið hvarfast ekki kröftuglega við vatn skal næst byrja á 4. þrepi (1.3.4).

1.3.1. **1. þrep**

Prófunarefnið er sett í grunnt ílát sem inniheldur eimað vatn, sem er 20 °C, og athugað hvort kviknar í lofttegundinni sem myndast.

1.3.2. **2. þrep**

Prófunarefnið er sett á síupappír sem flýtur á yfirborði disks með eimuðu vatni, sem er 20 °C, og athugað hvort kviknar í lofttegundinni sem myndast. Síupappírinn þjónar einungis þeim tilgangi að halda efninu á einum og sama stað til að auka líkurnar á íkviknun.

1.3.3. **3. þrep**

Búin er til lengja úr prófunarefninu, u.þ.b. 2 cm há og 3 cm í þvermál. Nokkrir dropar af vatni eru settir í lengjuna og athugað hvort kviknar í lofttegundinni sem myndast.

1.3.4. **4. þrep**

Prófunarefninu er blandað saman við eimað vatn, sem er 20 °C, og hraðinn á myndun lofttegundar er mældur á klukkustundar fresti í sjö klukkustundir. Ef myndunarhraðinn er ójafn eða fer vaxandi eftir sjö klukkustundir skal lengja mælitímann í allt að fimm daga. Stöðva má prófunina ef hraðinn fer á einhverjum tíma yfir 1 lítra/kg á klukkustund.

1.4. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki tilgreind.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ekki tilgreindar.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐUM

1.6.1. **1. þrep**

1.6.1.1. *Prófunarskilyrði*

Prófunin er gerð við stofuhita (u.þ.b. 20 °C).

1.6.1.2. *Framkvæmd prófunarinnar*

Lítið eitt af prófunarefni (u.þ.b. 2 mm í þvermál) er sett í grunnt ílát með eimuðu vatni. Skrá skal (i) hvort lofttegund myndast og (ii) hvort það kviknar í lofttegundinni. Ef það kviknar í lofttegundinni eru frekari prófanir óþarfar þar eð efnið telst hættulegt.

1.6.2. **2. þrep**

1.6.2.1. *Búnaður*

Síupappír er lagður flatur á yfirborð eimaðs vatns í hentugu íláti, t.d. uppgufunarskál sem er 100 mm í þvermál.

1.6.2.2. *Prófunarskilyrði*

Prófunin er gerð við stofuhita (u.þ.b. 20 °C).

1.6.2.3. *Framkvæmd prófunarinnar*

Lítið eitt af prófunarefni (u.þ.b. 2 mm í þvermál) er sett á síupappírinn miðjan. Skrá skal (i) hvort lofttegund myndast og (ii) hvort það kviknar í lofttegundinni. Ef það kviknar í lofttegundinni eru frekari prófanir óþarfar þar eð efnið telst hættulegt.

1.6.3. **3. þrep**

1.6.3.1. *Prófunarskilyrði*

Prófunin er gerð við stofuhita (u.þ.b. 20 °C).

1.6.3.2. *Framkvæmd prófunarinnar*

Búin er til lengja úr prófunarefninu, u.þ.b. 2 cm há og 3 cm í þvermál og með dæld efst. Nokkrir dropar af vatni eru settir í dældina og athugað (i) hvort lofttegund myndast og (ii) hvort kviknar í lofttegundinni. Ef það kviknar í lofttegundinni eru frekari prófanir óþarfar þar eð efnið telst hættulegt.

1.6.4. **4. þrep**

1.6.4.1. *Búnaður*

Búnaðurinn er settur upp eins og sýnt er á myndinni.

1.6.4.2. *Prófunarskilyrði*

Skoðið hvort í ílátinu með prófunarefninu sé duft sem er < 500 μm (agnastærð). Sé duftið meira en 1%, miðað við þyngd, af heildarmagninu eða sýnið auðmulið skal mylja allt sýnið í duft fyrir prófun svo að tekið sé tillit til minnkunar á agnastærð við geymslu og meðhöndlun en að öðrum kosti skal prófa efnið eins og það kemur fyrir. Prófunina skal gera við stofuhita (u.þ.b. 20 °C) og loftþrýsting.

1.6.4.3. *Framkvæmd prófunarinnar*

10 til 20 ml af vatni eru settir í dropatrekt búnaðarins og 10 g af efninu eru sett í keiluflöskuna. Rúmmál lofttegundarinnar, sem myndast, má mæla með einhverri hentugri aðferð. Skrúfað er frá krananum á dropatrektinni til að hleypa vatninu niður í keiluflöskuna og skeiðklukka sett af stað. Myndunarhraði lofttegundar er mældur á klukkustundar fresti í sjö klukkustundir. Ef myndunarhraði lofttegundar er ójafn á þessum tíma eða fer vaxandi í lok tímans skal halda mælingum áfram í allt að fimm daga. Stöðva má prófunina ef myndunarhraði lofttegundar fer á einhverjum tíma mælinganna yfir 1 lítra/kg á klukkustund. Þessa prófun skal gera þrisvar sinnum.

Ef efnakenni lofttegundarinnar er óþekkt skal greina lofttegundina. Ef lofttegundin hefur mjög eldfima efnisþætti og ekki er vitað hvort blandan í heild er mjög eldfim skal útbúa blöndu með sömu samsetningu og prófa hana samkvæmt aðferðinni í A.11.

2. **GÖGN**

Efnið telst hættulegt ef:

— sjálfsíkviknun á sér stað á einhverju stigi prófunarferlisins

eða

— eldfim lofttegund myndast er nemur 1 lítra/kg af efninu á klukkustund.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— ítarlegar upplýsingar um hvers kyns formeðhöndlun prófunarefnisins,

— niðurstöður prófana (1.–4. þrep),

— efnakenni lofttegundarinnar sem myndast,

— myndunarhraði lofttegundar ef 4. þrep (1.6.4) er notað,

— allar aðrar athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

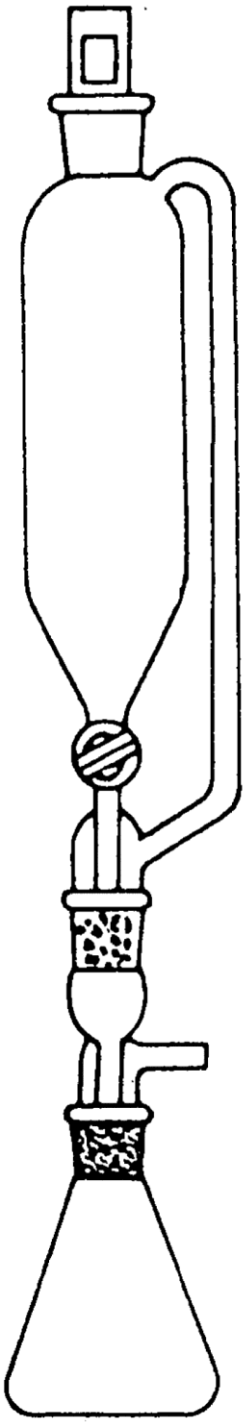
1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

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

Viðbætir

Mynd

Búnaður



A.13. LOFTKVEIKJANDI EIGINLEIKAR FASTRA EFNA OG VÖKVA

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Prófunarferlið hentar fyrir föst efni eða vökva sem kviknar í sjálfkrafa í litlu magni skömmu eftir að þau komast í snertingu við loft við stofuhita (um 20 °C).

Þessi prófunaraðferð gildir ekki fyrir efni sem þurfa að standa í snertingu við loft klukkustundum eða dögum saman eða við háan hita áður en kviknar í þeim.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Efni eru talin hafa loftkveikjandi eiginleika ef í þeim kviknar eða þau kolast við aðstæðurnar sem lýst er í 1.6.

Einnig getur verið nauðsynlegt að gera prófun á sjálfseldfimi vökva með aðferð A.15. Sjálfsíkveikjuhitastig (vökvar og gastegundir).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki tilgreind.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Efninu, hvort sem það er fast eða fljótandi, er bætt í óvirkt burðarefni og haft í snertingu við loft við umhverfishita í fimm mínútur. Vökvar, sem ekki kviknar í, eru sogaðir upp í síupappír og hafðir í snertingu við loft við umhverfishita (um 20 °C) í fimm mínútur. Föst efni og vökvar, sem kviknar í, og vökvar, sem kveikja í eða kola síupappír, teljast loftkveikjandi.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Endurtekningarnákvæmni: þar eð mikilvægt er að gæta fyllsta öryggis nægir ein jákvæð niðurstaða til að efnið teljist loftkveikjandi.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Postulínsskál, sem er um 10 cm í þvermál, er fyllt með kísilgúr upp í u.þ.b. 5 mm hæð við stofuhita (um 20 °C).

Athugasemd:

Kísilgúr, eða eitthvert annað sambærilegt, hvarftregt efni sem auðvelt er að nálgast, skal teljast dæmigerður fyrir jarðveginn sem prófunarefnið gæti farið niður í við óhapp.

Nauðsynlegt er að nota þurran síupappír við prófun á vökvum sem ekki kviknar í við snertingu við loft ef þeir eru í snertingu við hvarftreg burðarefni.

1.6.2. **Framkvæmd prófunarinnar**

a) *Duftkennd, föst efni*

1 til 2 cm^3 af efninu, sem prófa skal, er hellt úr u.þ.b. 1 m hæð á eldtraustan flöt og fylgst með hvort það kviknar í efninu í fallinu eða innan fimm mínútna eftir að það sest.

Prófunin er gerð sex sinnum nema íkviknun eigi sér stað.

b) *Vökvar*

Um 5 cm^3 af vökvanum, sem prófa skal, er hellt í postulínsskálina sem undirbúin var og fylgst með hvort það kviknar í efninu innan fimm mínútna.

Ef aldrei kviknar í efninu í sex prófunum skal gera eftirfarandi prófanir:

0,5 ml af prófunarsýni er fært með sprautu á brotinn síupappír og athugað hvort það kviknar í síupappírnum eða hann kolast innan fimm mínútna frá því að vökvanum var bætt á. Prófunin er gerð þrisvar sinnum nema íkviknun eða kolun eigi sér stað.

2. GÖGN

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Hætta má prófunum um leið og jákvæð niðurstaða fæst í einhverri þeirra.

2.2. MAT

Ef það kviknar í efninu innan fimm mínútna frá því að það er sett á hvarftregt burðarefni og haft í snertingu við loft eða ef vökvi kolar eða kveikir í síupappír innan fimm mínútna frá því að hann er settur á síupappírinn og hafður í snertingu við loft þá telst efnið vera loftkveikjandi.

3. SKÝRSLUGJÖF

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— niðurstöður prófananna,

— allar aðrar athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

4. HEIMILDIR

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

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

A.14. **SPRENGIFIMI**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Aðferðin felur í sér prófunaráætlun til að ákvarða hvort hætta sé á sprengingu í föstu eða deigkenndu efni verði það fyrir áhrifum af loga (varmanæmi) eða höggi eða núningi (næmi fyrir aflrænu álagi) og hvort hætta sé á sprengingu í vökva ef hann verður fyrir áhrifum af loga eða höggi.

Aðferðin er í þremur hlutum:

a) prófun á varmanæmi (1. heimild),

b) prófun á aflrænu næmi fyrir áhrifum af höggi (1. heimild),

c) prófun á aflrænu næmi fyrir áhrifum af núningi (1. heimild).

Með þessari aðferð fást gögn til að meta líkurnar á að sprenging verði við tiltekið, algengt áreiti. Aðferðin er ekki ætluð til ákvörðunar á því hvort efnið geti yfirleitt sprungið.

Aðferðin hentar til að ákvarða hvort hætta sé á sprengingu í efninu (varma- og aflfræðilegt næmi) við þau tilteknu skilyrði sem eru tilgreind í tilskipuninni. Hún miðast við nokkrar tegundir tækjabúnaðar sem er notaður um allan heim (1. heimild) og gefur venjulega nothæfar niðurstöður. Það skal viðurkennt að aðferðin gefur ekki afdráttarlausa niðurstöðu. Nota má annan búnað en tilgreindur er, að því tilskildu að hann sé alþjóðlega viðurkenndur og unnt sé að sýna á fullnægjandi hátt fram á fylgni niðurstaðnanna, sem fást með slíkum búnaði, við niðurstöðurnar sem fást með tilgreinda búnaðinum.

Prófanirnar þarf ekki að framkvæma ef tiltækar upplýsingar um varmafræði efnisins (s.s. um myndunarvarma og niðurbrotsvarma), og/eða það að tilteknir, hvarfgjarnir hópar (2. heimild) eru ekki í byggingarformúlu efnisins, staðfesta svo hafið er yfir skynsamlegan vafa að efnið getur ekki brotnað hratt niður og myndað við það lofttegundir eða gefið frá sér varma (þ.e. ekki stafar sprengihætta af efninu). Þegar um er að ræða vökva er ekki krafist prófana á aflrænu næmi fyrir áhrifum af núningi.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Sprengifim efni:

Efni sem geta sprungið við áhrif af loga eða eru næm fyrir höggum eða núningi í tilgreinda búnaðinum (eða næmari fyrir aflrænu álagi en 1,3-dínítróbensen í öðrum búnaði).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

1,3-dínítróbensen, tæknileg, kristölluð vara, sigtuð gegnum 0,5 mm möskva, fyrir núnings- og höggaðferðir.

Perhýdró-1,3,5-trínítró-1,3,5-tríasín (RDX, hexógen, sýklónít — CAS 121-82-4), endurkristallað úr sýklóhexanóni í vatnslausn, votsigtað gegnum 250 µm möskva og látið liggja og þorna á sigti með 150 µm möskvum við 103 ± 2 °C (í fjórar klukkustundir) í annarri umferð núnings- og höggprófana.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Forprófanir eru nauðsynlegar til að ákvarða öruggar aðstæður fyrir framkvæmd næmisprófananna þriggja.

1.4.1. **Prófanir til að tryggja öryggi við meðhöndlun (3. heimild)**

Á undan meginprófununum eru, af öryggisástæðum, tekin mjög lítil sýni (um 10 mg) af efninu og hituð í opnu rými í gasloga, þau látin verða fyrir höggi í einhverjum hentugum búnaði og fyrir núningi með því að nota hamar og steðja eða einhvers konar núningstæki. Tilgangurinn er að komast að því hvort efnið er svo næmt og sprengifimt að gæta þurfi sérstakrar varúðar við næmisprófanirnar sem mælt er fyrir um, einkum varmanæmisprófunina, til að rannsóknarmenn slasist ekki.

1.4.2. **Varmanæmi**

Í þessari aðferð er efnið hitað í stálröri, sem er lokað með stútplötum (e. *orifice plate*) með opum með mismunandi þvermál, til að ákvarða hvort líklegt sé að efnið springi við mikið varmaálag og í vel skilgreindu, lokuðu rými.

1.4.3. **Aflrænt næmi (högg)**

Í þessari aðferð eru föst eða deigkennd efni látin verða fyrir höggi frá tilgreindu lóði sem er látið falla úr tiltekinni hæð.

1.4.4. **Aflrænt næmi (núningur)**

Í þessari aðferð eru föst eða deigkennd efni látin verða fyrir núningi milli staðalyfirborða við tiltekið álag og tiltekna, hlutfallslega hreyfingu.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ekki tilgreindar.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐ

1.6.1. **Varmanæmi (áhrif af loga)**

1.6.1.1. *Búnaður*

Búnaðurinn er samanstendur af einnota stálröri með margnota lokunarbúnaði (mynd 1) sem komið er fyrir er í búnaði til hitunar og hlífðar. Rörin eru úr seighertu plötustáli (sjá viðbæti) og eru 24 mm að innra þvermáli, 75 mm að lengd og veggþykkt er 0,5 mm. Rörin eru með kraga á opna endanum til að hægt sé að loka þeim með stútplötubúnaðinum. Í hann er notuð þrýstiþolin stútplata sem er með opi í miðjunni og tryggilega fest við rörið með skrúfutengingu í tveimur hlutum (ró og snittuðum kraga). Róin og snittaði kraginn eru úr krómmanganstáli (sjá viðbæti) sem er neistalaust upp að 800 °C. Stútplöturnar eru 6 mm þykkar, gerðar úr hitaþolnu stáli (sjá viðbæti) og fást með opum með mismunandi þvermáli.

1.6.1.2. *Prófunarskilyrði*

Venjulega er efnið prófað eins og það kemur fyrir en þó getur í sumum tilvikum, t.d. ef það er pressað, mótað eða þjappað á annan hátt, verið nauðsynlegt að mola efnið áður en það er prófað.

Þegar um föst efni er að ræða er notuð forprófun (e. *dry run procedure*) í tveimur þrepum til að ákvarða hversu mikið skuli nota af efninu í hverri prófun. Í tarað rör eru settir 9 cm^3 af efni og efnið þjappað með 80 N krafti sem beitt er á allt þversnið rörsins. Af öryggisástæðum eða í tilvikum þar sem eðlisástand sýnisins getur breyst við þjöppun má nota annað áfyllingarferli, t.d. hentar þjöppun ekki ef efnið er mjög næmt fyrir núningi. Ef unnt reynist að þjappa efnið er bætt við það og þjappað aftur þar til rörið hefur verið fyllt upp að 55 mm frá efri brún. Heildarmassinn, sem hefur verið notaður til að fylla rörið að 55 mm markinu, er ákvarðaður og enn bætt við tveimur skömmtum sem eru þjappaðir með 80 N krafti hvor um sig. Eftir það er efni annaðhvort bætt við og þjappað eða tekið af því, eftir þörfum, uns rörið er að lokum fyllt upp að 15 mm frá efri brún. Þá er gerð önnur forprófun og byrjað með þjappað efni sem svarar til þriðjungs af heildarmassanum sem var ákvarðaður í fyrri forprófuninni. Tveimur slíkum skömmtum er bætt við og þeir þjappaðir með 80 N krafti og hæð efnisins í rörinu er jöfnuð að 15 mm frá efri brún með því að bæta við efni eða taka af því eftir þörfum. Í hverja prófun er notað það efnismagn sem var ákvarðað í síðari forprófuninni, efnið er sett í rörið í þremur jafnstórum skömmtum og hver skammtur þjappaður í 9 cm^3 með þeim krafti sem til þarf. (Til hagræðis má nota millihringi).

Vökvar og hlaupkennd efni eru sett í rörið upp að 60 mm hæð og þess sérstaklega gætt að ekki myndist loftbólur í hlaupefnum. Snittaða kraganum er smeygt á rörið neðan frá, viðeigandi stútplata sett á, borið á smurefni, sem inniheldur mólýbdendísúlfíð, og róin hert. Afar mikilvægt er að ganga úr skugga um að ekkert af efninu hafi lent á milli kragans og plötunnar eða í skrúfganginum.

Hitað er með própani sem er tekið úr iðnaðargaskúti með þrýstistilli (60–70 millibör), leitt í gegnum mæli og dreift jafnt (þess er gætt með sjónrænni skoðun á logunum frá brennurunum) eftir soggrein til fjögurra brennara. Brennararnir eru staðsettir kringum prófunarhólfið eins og sýnt er á mynd 1. Brennararnir fjórir nota samtals um 3,2 lítra af própani á mínútu. Nota má annars konar brennslugas og brennara en hitunarhraðinn verður að vera sá sem er tilgreindur á mynd 3. Um allan búnað gildir að fylgjast verður reglulega með hitunarhraðanum með því að nota rör sem fyllt eru með díbútýlþalati eins og sýnt er á mynd 3.

1.6.1.3. *Framkvæmd prófananna*

Hver prófun um sig varir þar til rörið splundrast eða hefur verið hitað í fimm mínútur. Ef prófun leiðir til þess að rörið splundrast í þrjú eða fleiri stykki, sem í sumum tilvikum geta þó hangið saman á mjóum málmræmum eins og sýnt er á mynd 2, þá telst það sprenging. Ef brotin eru færri eða rörið sundrast ekki telst ekki hafa orðið sprenging í prófuninni.

Fyrst er gerð röð þriggja prófana með stútplötu með opi sem er með 6,0 þvermáli og verði ekki sprenging er gerð önnur röð þriggja prófana en þá með stútplötu með opi með 2,0 mm þvermáli. Verði sprenging í annarri hvorri prófunarröðinni eru frekari prófanir óþarfar.

1.6.1.4. *Mat*

Prófunarniðurstaðan telst jákvæð ef sprenging verður í annarri hvorri prófunarröðinni hér á undan.

1.6.2. **Aflrænt næmi (högg)**

1.6.2.1. *Búnaður (mynd 4)*

Meginhlutar dæmigerðs fallhamarsbúnaðar eru steypustálsblokk með botnplötu, steðja, stöpli, stýriteinum, falllóðum, sleppibúnaði og sýnishaldara. Stálsteðjinn, sem er 100 mm (þvermál) × 70 mm (hæð), er skrúfaður ofan á stálblokk, sem er 230 mm (lengd) × 250 mm (breidd) × 200 mm (hæð), með steyptum botni, sem er 450 mm (lengd) × 450 mm (breidd) × 60 mm (hæð). Stöpull úr heildregnu stálröri er festur í haldara sem er skrúfaður á bakhlið stálblokkarinnar. Búnaðurinn er festur með fjórum skrúfum við gegnheila steinsteypublokk, sem er 60 × 60 × 60 cm, þannig að stýriteinarnir séu fullkomlega lóðréttir og lóðið falli hindrunarlaust. Til eru 5 og 10 kg lóð úr gegnheilu stáli. Höggflötur lóðanna er úr hertu stáli, HRC 60–63, og eigi minni en 25 mm í þvermál.

Sýnið, sem verið er að prófa, er lokað inni í höggbúnaði sem er gerður úr tveimur samása, gegnheilum stálsívalningum, annar ofan á hinum, en utan um þá er holur, sívalur stýrihringur úr stáli. Gegnheilu stálsívalningarnir skulu vera 10 (– 0,003, – 0,005) mm í þvermál og 10 mm á hæð, með slípað yfirborð, ávalar brúnir (krappageisli 0,5 mm) og hörkuna HRC 58–65. Holi sívalningurinn skal vera 16 mm að ytra þvermáli, hafa slípað innra byrði, sem er 10 (+ 0,005, + 0,010) mm að þvermáli, og vera 13 mm á hæð. Höggbúnaðurinn er settur saman á millisteðja úr stáli (26 mm í þvermál og 26 mm á hæð) sem er miðjaður með hring með opum þar sem gufa getur streymt út.

1.6.2.2. *Prófunarskilyrði*

Rúmmál sýnisins skal vera 40 mm^3 eða það rúmmál sem hentar í öðrum tækjabúnaði. Föst efni skal prófa þurr og undirbúa þau sem hér segir:

a) Dyft efni eru sigtuð (í sigti með 0,5 mm möskvum) og allt sem fer í gegnum sigtið er notað í prófuninni.

b) Efni sem hafa verið pressuð, steypt eða þjöppuð á annan hátt eru brotin í smátt og sigtuð; sá hluti sáldsins, sem er 0,5–1 mm í þvermál, er notaður í prófuninni og skal vera dæmigerður fyrir upprunalega efnið.

Efni sem eru venjulega seld í deigkenndu formi skulu prófuð þurr þegar því verður við komið eða a.m.k. eftir að þynningarefnið hefur verið fjarlægt að því marki sem unnt er. Þegar fljótandi efni eru prófuð er haft 1 mm bil milli efri og neðri stálsívalningsins.

1.6.2.3. *Framkvæmd prófananna*

Gerðar eru sex prófanir þar sem 10 kg lóðið er látið falla úr 0,40 m hæð (40 J). Verði sprenging í þessum sex prófunum við 40 J verður að gera aðrar sex prófanir þar sem 5 kg lóð er látið falla úr 0,15 m hæð (7,5 J). Í öðrum tækjabúnaði er sýnið borið saman við viðmiðunarefnið, sem valið hefur verið, og notað til þess viðurkennt verkferli (t.d. upp og niður-aðferðin).

1.6.2.4. *Mat*

Niðurstaða prófunar telst jákvæð ef sprenging (blossi og/eða hvellur jafngilda sprengingu) verður a.m.k. einu sinni í einni prófuninni með hinum tilgreinda höggbúnaði eða ef sýnið er næmara en 1,3-dínítró-bensen eða RDX-sprengiefni í annars konar höggprófun.

1.6.3. **Aflrænt næmi (núningur)**

1.6.3.1. *Búnaður (mynd 5)*

Núningsbúnaðurinn er gerður úr botnplötu úr steypustáli sem núningstækið er fest á. Tækið er gert úr föstum postulínsstaut og hreyfanlegri postulínsplötu. Postulínsplatan er fest í sleða sem rennur á tveimur teinum. Sleðinn er tengdur rafmagnshreyfli með tengistöng, ósammiðja kambhjóli og viðeigandi drifi þannig að postulínsplatan færist, aðeins einu sinni, fram og aftur fyrir neðan postulínsstautinn um 10 mm. Álag á postulínsstautinn má vera t.d. 120 eða 360 njúton.

Postulínsplöturnar eru flatar og úr hvítu tæknipostulíni (hrjúfleiki 9–32 µm) og stærðarmál þeirra eru 25 mm (lengd) × 25 mm (breidd) × 5 mm (hæð). Sívali postulínsstauturinn er einnig úr hvítu tæknipostulíni og er 15 mm að lengd, 10 mm í þvermál og með hrjúfa, kúpta endafleti með 10 mm krappageisla.

1.6.3.2. *Prófunarskilyrði*

Rúmmál sýnisins skal vera 10 mm^3 eða það rúmmál sem hentar í öðrum tækjabúnaði.

Föst efni skal prófa þurr og undirbúa þau sem hér segir:

a) Dyft efni eru sigtuð (í sigti með 0,5 mm möskvum) og allt sem fer í gegnum sigtið er notað í prófuninni.

b) Efni, sem hafa verið pressuð, steypt eða þjöppuð á annan hátt, eru brotin í smátt og sigtuð; í prófuninni er notaður sá hluti sáldsins sem er með < 0,5 mm agnaþvermál.

Efni, sem eru venjulega seld í deigformi, skal prófa í þurru formi ef því verður við komið. Ef ekki er hægt að þurrka efnið er deigið (eftir að eins mikið af þynningarefninu hefur verið fjarlægt og kostur er) prófað sem 0,5 mm þykk, 2 mm breið og 10 mm löng filma sem er lögð með þar til gerðu móti.

1.6.3.3. *Framkvæmd prófananna*

Postulínspinninn er færður yfir á prófunarsýnið og sett á hann álag. Þegar prófið er framkvæmt skulu rákir eftir fægingu postulínsplötunnar liggja þvert á hreyfistefnu. Gæta skal þess að stauturinn hvíli á sýninu, að nægilegt prófunarefni liggi undir stautnum og einnig að platan hreyfist á réttan hátt undir stautnum. Þegar efnið er deigkennt er það lagt á plötuna með 0,5 mm þykku móti með 2 x 10 mm opi. Postulínsplatan þarf að hreyfast 10 mm vegalengd fram og aftur undir postulínsstautnum á 0,44 sekúndum. Hvern hluta af yfirborði plötunnar og stautsins má einungis nota einu sinni, endafletir stautsins nýtast í tvær tilraunir og hvor hlið plötunnar í þrjár tilraunir.

Gerðar eru sex prófanir með 360 N álagi. Verði sprenging í þessum sex prófunum verður að gera aðrar sex prófanir með 120 N álagi. Í öðrum tækjabúnaði er sýnið borið saman við viðmiðunarefni, sem valið hefur verið, og notað til þess viðurkennt verkferli (t.d. upp og niður-aðferðin o.s.frv.).

1.6.3.4. *Mat*

Niðurstaða prófunar telst jákvæð ef sprenging (snark og/eða hvellur eða blossi jafngildir sprengingu) verður a.m.k. einu sinni í einhverri prófuninni með hinum tilgreinda núningsbúnaði eða ef niðurstaðan fullnægir sambærilegum viðmiðunum í annars konar núningsprófun.

2. **GÖGN**

Að jafnaði telst stafa sprengihætta af efni í skilningi tilskipunarinnar ef jákvæð niðurstaða fæst í prófun á varmanæmi, höggnæmi eða núningsnæmi.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— auðkenni prófunarefnisins, samsetning, hreinleiki, rakainnihald o.s.frv.,

— eðlisástand sýnisins og hvort það hefur verið molað, brotið og/eða sigtað,

— athuganir sem gerðar eru við varmanæmisprófunina (t.d. massi sýnisins, fjöldi brota, o.s.frv.),

— athuganir sem gerðar eru við prófanir á aflrænu næmi (t.d. mikil reykmyndun eða algert niðurbrot án hvells, logar, neistar, hvellur, snark o.s.frv.),

— niðurstöður úr hverjum prófunarflokki,

— sé notaður annar búnaður en sá sem hér er tilgreindur skal setja fram vísindaleg rök fyrir því ásamt rökstuddum vísbendingum um fylgni milli niðurstaðna sem fást með tilgreinda búnaðinum og þeirra sem fást með jafngildum búnaði,

— hvers konar gagnlegar athugasemdir, s.s. tilvísanir í prófanir á svipuðum vörum sem gætu skipt máli fyrir rétta túlkun á niðurstöðunum,

— allar aðrar athugasemdir sem máli skipta við túlkun niðurstaðna.

3.2. TÚLKUN OG MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Í prófunarskýrslunni skal greina frá öllum niðurstöðum sem taldar eru rangar, afbrigðilegar eða ekki dæmigerðar. Ef einhverjar niðurstöður eru afskrifaðar skal gefa skýringu á því ásamt niðurstöðum allra staðgönguprófana eða viðbótarprófana. Ef afbrigðileg niðurstaða verður ekki skýrð skal hún tekin gild og notuð við flokkun efnisins.

4. HEIMILDIR

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

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

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

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

Viðbætir

Dæmi um efnislýsingu fyrir varmanæmisprófun (sjá DIN 1623)

1) Rör: Efnislýsing nr. 1.0336.505 g

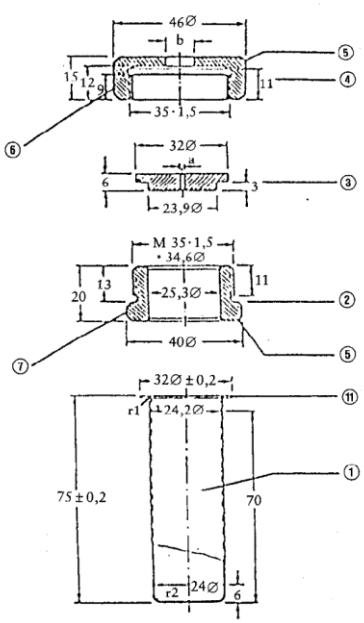
2) Stútplata: Efnislýsing nr. 1.4873

3) Snittaður kragi og ró: Efnislýsing nr. 1.3817

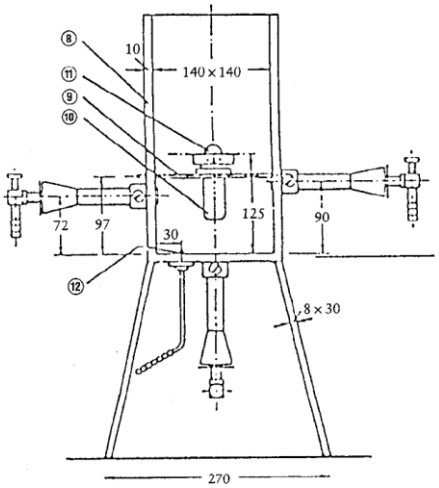
Mynd 1

Búnaður til prófunar á varmanæmi

(öll mál eru í mm)



Mynd 1a Stálrör og fylgihlutir



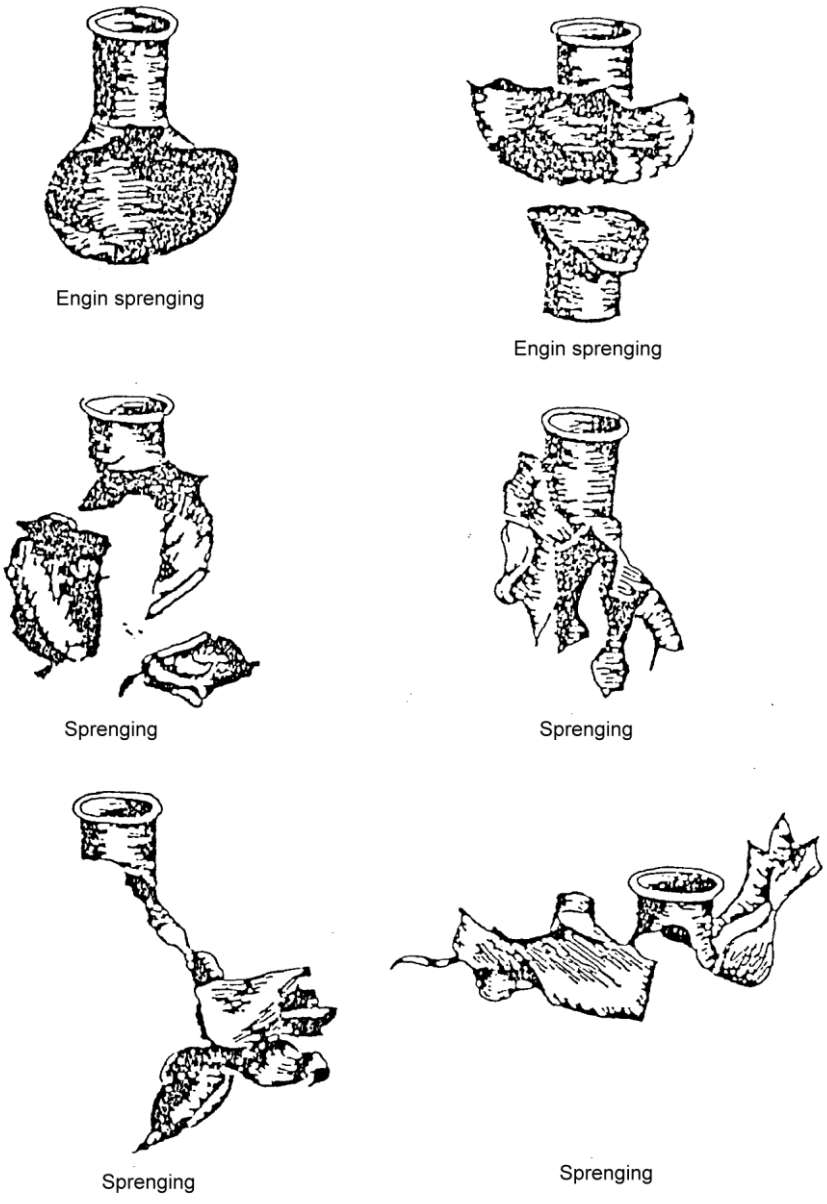
Mynd 1b Hitunar- og hlífðarbúnaður

1) rör
(1a) ytri kragi
2) snittaður kragi, skrúfgangur með litlu viðnámi
3) stútplata a = 2,0 eða 6,0 mm í þvermál
4) ró b = 10 mm í þvermál
5) sniðskorið yfirborð
6) 2 flata lykilgrip fyrir 41 mm lykil
7) 2 flata lykilgrip fyrir 36 mm lykil
8) kassi sem þolir sprengjubrot
9) 2 stuðningsstangir fyrir rör
10) samsett rör
11) staðsetning aftari brennara, hinir brennararnir sjást
12) stýriúðari (e. *pilot jet*)

Mynd 2

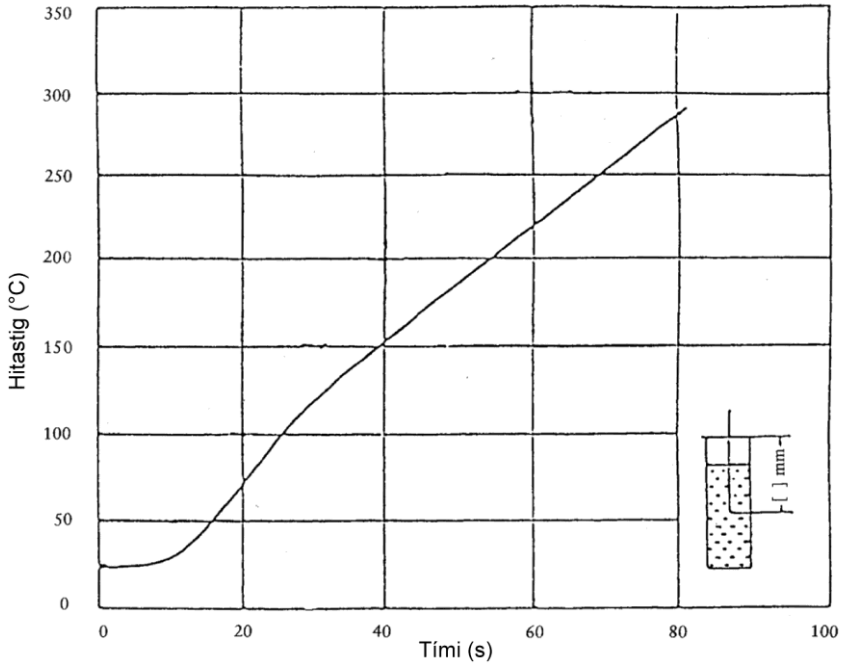
Prófun á varmanæmi

(dæmi um sundrun)



Mynd 3

Kvörðun á hitunarhraða fyrir prófun á varmanæmi

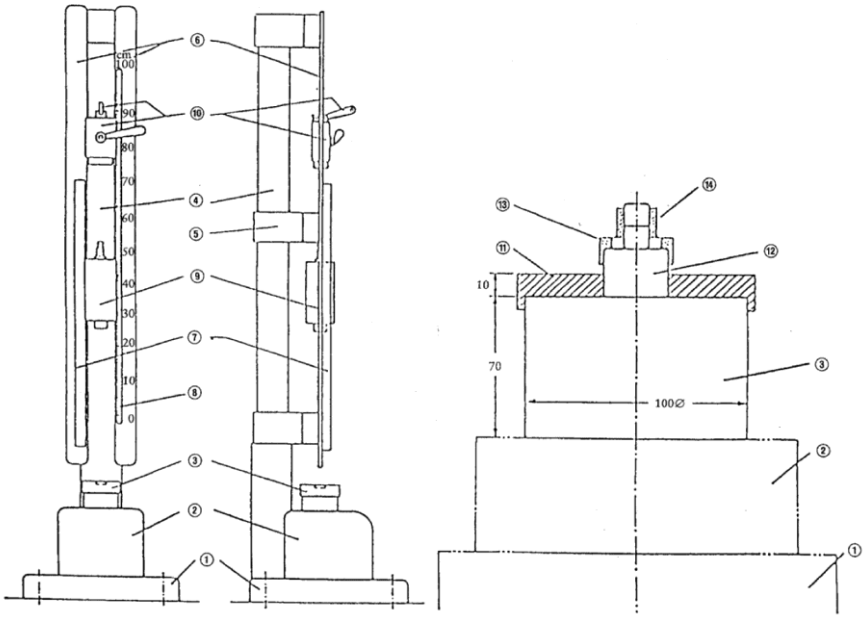


Línurit af hita sem falli af tíma við upphitun díbútýlþalats (27 cm^3) í lokuðu röri (stútplata með 1,5 mm opi) með 3,2 lítra própanrennsli á mínútu. Hitastigið er mælt með snertispennunema, sem er 1 mm í þvermál, úr krómeli og álúmeli, slíðraður með ryðfríu stáli og komið fyrir í miðjunni, 43 mm fyrir neðan efri brún rörsins. Á bilinu 135 °C og 285 °C skal hitunarhraðinn vera 185–215 K/mín.

Mynd 4

Búnaður fyrir höggprófun

(öll mál eru í mm)



Mynd 4a Fallhamar, að framan og á hlið, yfirlitsmynd

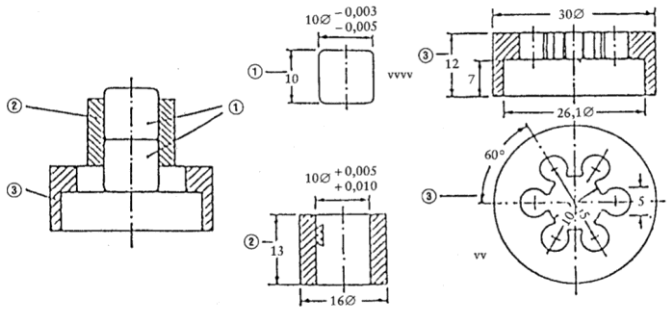
1) botnplata, 450 × 450 × 60
2) stálblokk, 230 × 250 × 200
3) steðji, 100 (þvermál) × 70 (hæð)
4) stöpull
5) miðjuþverstöng
6) 2 stýriteinar
7) tannstöng

Mynd 4b Fallhamar, neðri hluti

8) kvarði
9) fallhamar (falllóð)
10) búnaður til að halda og sleppa
11) staðsetningarplata
12) millisteðji (sem skipta má um), 26 (þvermál) × 26 (hæð)
13) staðsetningarhringur með opum
14) höggtæki

Mynd 4

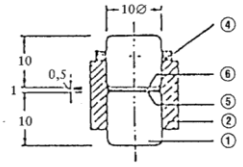
Framhald

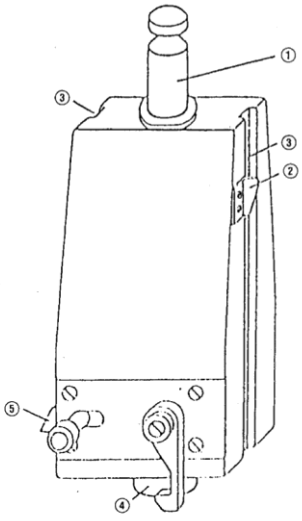


Mynd 4c Höggbúnaður fyrir dyft eða deigkennd efni

Mynd 4d Höggbúnaður fyrir vökva

1) stálsívalningar
2) stýrihringur fyrir stálsívalningana
3) staðsetningarhringur með opum
a) lóðrétt snið
b) grunnteikning
4) gúmmíhringur
5) fljótandi efni (40 mm^3)
6) vökvalaust rými



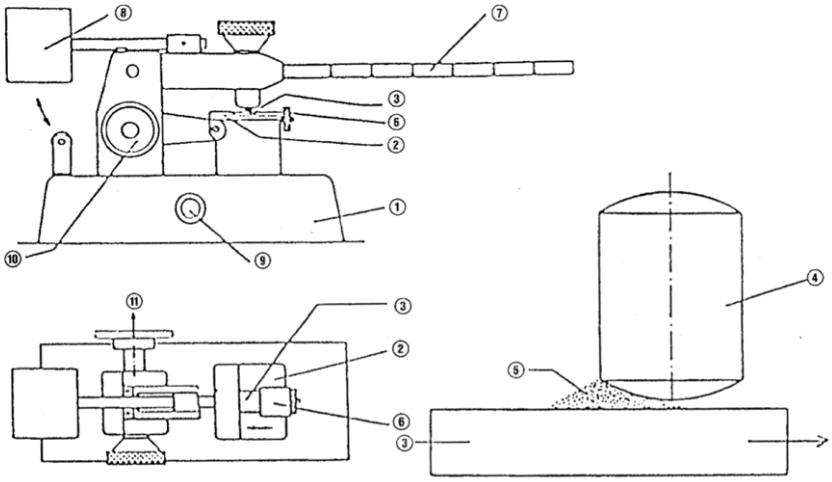


Mynd 4e Hamar (falllóð 5 kg)

1) upphengipinni
2) hæðarmerki
3) stýrirauf
4) sívalur slaghaus
5) afturkaststálmi (e. rebound catch)

Mynd 5

Búnaður fyrir prófun á núningsnæmi



Mynd 5a Núningsbúnaður, yfirlitsmynd ofan frá og frá hlið

1) botnplata úr stáli
2) færanlegur sleði
3) postulínsplata, 25 × 25 × 5 mm, fest á sleða
4) fastur postulínsstautur, 10 (þvermál) × 15 mm
5) prófunarsýni, u.þ.b. 10 mm^3

Mynd 5b Upphafsstaða stautsins á sýninu

6) stautfesta
7) álagsarmur
8) mótlóð
9) rofi
10) hjól til að stilla sleðann á upphafsstöðu
11) til rafhreyfils

A.15. SJÁLFSÍKVEIKJUHITASTIG (VÖKVAR OG LOFTTEGUNDIR)

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sprengifim efni og efni, sem kviknar sjálfkrafa í við snertingu við loft við stofuhita, skulu ekki prófuð með þessari aðferð. Prófunarferlið hentar fyrir lofttegundir, vökva og gufur sem kviknað getur í út frá heitum yfirborðsfleti þar sem loft er fyrir hendi.

Hvatandi óhreinindi, efnið í yfirborðinu og prófunarílát með stærra rúmmáli geta lækkað sjálfs-íkveikjuhitastigið talsvert.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Sjálfsíkveikjuhitastigið er mælikvarði á tilhneigingu efnisins til sjálfsíkveikju. Sjálfsíkveikjuhitastigið er lægsta hitastigið sem leiðir til íkviknunar í prófunarefninu þegar það er blandað lofti við aðstæðurnar sem eru skilgreindar í prófunaraðferðinni.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni eru tilgreind í stöðlunum (sjá 1.6.3). Slík efni ber fyrst og fremst nota öðru hvoru til að fylgjast með nothæfi aðferðarinnar og til samanburðar við niðurstöður sem eru fengnar með öðrum aðferðum.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Með aðferðinni er ákvarðað það lágmarkshitastig á innra yfirborði lokaðs rýmis sem leiðir til íkviknunar í gasi, gufu eða vökva sem er sprautað inn í rýmið.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Endurtekningarnákvæmnin er breytileg eftir hitasviði sjálfsíkveikju og prófunaraðferðinni sem notuð er.

Næmið og sértækið ráðast af prófunaraðferðinni sem notuð er.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Búnaðinum er lýst í aðferðinni sem um getur í 1.6.3.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

Sýni af prófunarefninu er prófað samkvæmt aðferðinni sem um getur í 1.6.3.

1.6.3. **Framkvæmd prófunarinnar**

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

2. **GÖGN**

Skrá skal prófunarhitastig, loftþrýsting, magn sýnis sem notað er og biðtímann þar til íkviknun verður.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— nákvæm lýsing á efninu (auðkenni og óhreinindi),

— magn sýnis sem er notað, loftþrýstingur,

— búnaðurinn sem er notaður,

— niðurstöður mælinga (prófunarhitastig, niðurstöður varðandi íkviknun og tilheyrandi biðtími),

— allar aðrar athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

Engar.

A.16. **HLUTFALLSLEGT SJÁLFSÍKVIKNUNARHITASTIG (FÖST EFNI)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sprengifim efni og efni, sem kviknar sjálfkrafa í við snertingu við loft við stofuhita, skulu ekki prófuð með þessari aðferð.

Tilgangurinn með þessari prófun er að afla upplýsinga fyrir fram um sjálfseldfimi fastra efna við hátt hitastig.

Ef varminn sem myndast, annaðhvort við efnahvarf efnisins við súrefni eða við útvermið niðurbrot þess, tapast ekki nægilega hratt út í umhverfið verður sjálfshitun sem leiðir til sjálfsíkviknunar. Sjálfsíkviknun verður því þegar hraði varmamyndunar er meiri en hraði varmataps.

Prófunarferlið er gagnlegt sem forskimunarprófun fyrir föst efni. Í ljósi þess að eðli íkviknunar og bruna fastra efna er mjög flókið skal eingöngu nota sjálfsíkviknunarhitastigið, sem er ákvarðað samkvæmt þessari prófunaraðferð, til samanburðar.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Sjálfsíkviknunarhitastigið, sem fæst með þessari aðferð, er lægsti umhverfishiti, skráður í °C, sem leiðir til íkviknunar í tilteknu rúmmáli efnis við skilgreindar aðstæður.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Tiltekið rúmmál af prófunarefninu er sett í ofn við stofuhita, hitinn í miðju sýninu er skráður sem fall af tíma meðan ofnhitinn er hækkaður í 400°C, eða upp að bræðslumarki ef það er lægra, með hraðanum 0,5 °C/mín. Að því er varðar þessa prófun er ofnhitastigið, sem nægir til að sýnið hitni í 400°C með sjálfshitun, kallað sjálfsíkviknunarhitastigið.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

1.6.1.1. *Ofn*

Hitastilltur rannsóknarstofuofn (rúmmál um 2 lítrar) með eðlilegri hringrás lofts og búnaði sem dregur úr áhrifum sprengingar (e. *explosion relief*). Til að koma í veg fyrir hugsanlega sprengihættu mega lofttegundir, sem myndast vegna niðurbrots, ekki komast í snertingu við rafmagnshitaldið.

1.6.1.2. *Vírnetsteningur*

Vírnetsbútur úr ryðfríu stáli með 0,045 mm möskvum er klipptur samkvæmt sniðinu á mynd 1. Vírnetið er brotið saman í tening, sem er opinn að ofan, og fest saman með vír.

1.6.1.3. *Snertispennunemar*

Hentugir snertispennunemar.

1.6.1.4. *Riti*

Tveggja rása riti sem er kvarðaður frá 0–600 °C eða fyrir samsvarandi spennu.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

Efni eru prófuð eins og þau koma fyrir.

1.6.3. **Framkvæmd prófunarinnar**

Teningurinn, sem á að prófa, er fylltur með efninu og slegið laust á hann til að unnt sé að bæta meira af efninu við uns teningurinn er alveg fullur. Teningurinn er þá hengdur upp í miðju ofnsins við stofuhita. Annar snertispennuneminn er settur í miðju teningsins og hinn milli teningsins og ofnveggjarins til að skrá ofnhitastigið.

Hitastigið í ofninum og í sýninu eru skráð samfellt meðan ofnhitastigið er hækkað í 400 °C, eða upp að bræðslumarkinu ef það er lægra, með hraðanum 0,5 °C/mín.

Þegar kviknar í efninu sýnir snertispennuneminn í sýninu mjög snarpa hitahækkun upp fyrir ofnhitastigið.

2. **GÖGN**

Ofnhitastigið, sem nægir til að sýnið hitni í 400 °C með sjálfshitun, skiptir máli fyrir matið (sjá mynd 2).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— lýsing á prófunarefninu,

— niðurstöður mælinga, að meðtöldum hitastigs-/tímaferlinum,

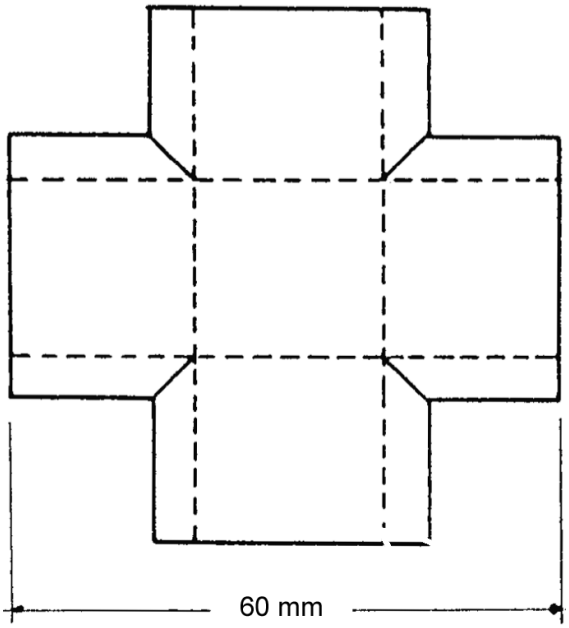
— allar aðrar athugasemdir sem máli skipta við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

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

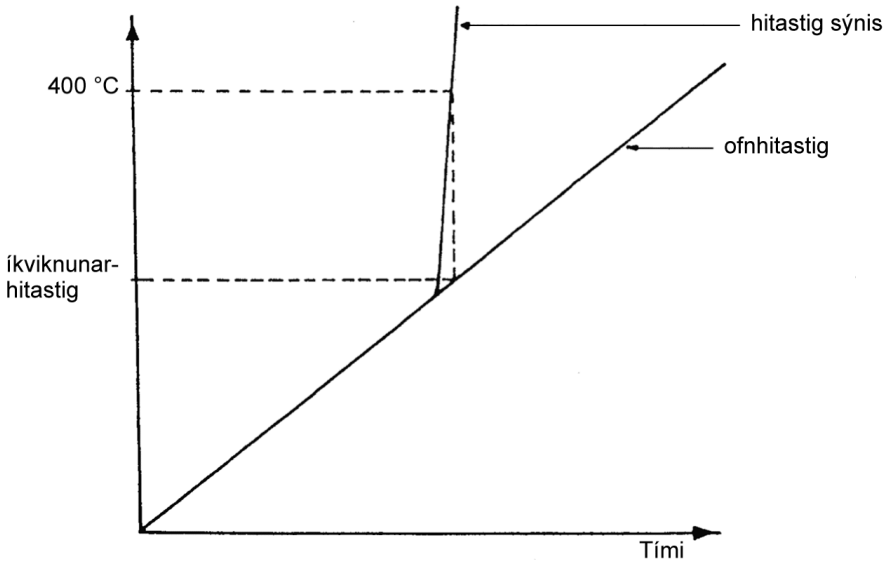
Mynd 1

Snið fyrir 20 mm prófunartening



Mynd 2

Dæmigerður hitastigs-/tímaferill



A.17. **OXUNAREIGINLEIKAR (FÖST EFNI)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga um hugsanlega sprengifimi efnisins áður en þessi prófun er gerð.

Þessi prófun hentar ekki fyrir vökva, lofttegundir, sprengifim efni eða mjög eldfim efni eða lífræn peroxíð.

Ekki þarf að gera þessa prófun ef athugun á byggingarformúlu efnisins sýnir ótvírætt að það getur ekki hvarfast á útverminn hátt við brennanlegt efni.

Gera skal forprófun til að komast að því hvort gera þurfi sérstakar varúðarráðstafanir við prófunina.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Brunatími: sá hvarftími, í sekúndum, sem það tekur hvarfsvæðið að breiðast út í lengju af efninu, samkvæmt verkferlinu sem lýst er í 1.6.

Brunahraði: táknaður í millimetrum á sekúndu.

Hámarksbrunahraði: hæsta gildi brunahraðans sem mælist í blöndum sem innihalda 10–90% af oxara miðað við þyngd.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Baríumnítrat (af greiningarhreinleika) er notað sem viðmiðunarefni í prófun og forprófun.

Viðmiðunarblandan er sú blanda af baríumnítrati og dyftu beðmi sem er útbúin samkvæmt 1.6 og hefur mestan brunahraða (yfirleitt blanda sem inniheldur 60% baríumnítrat miðað við þyngd).

1.4. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Forprófun er gerð í öryggisskyni. Ekki er þörf á frekari prófunum ef forprófunin sýnir greinilega að prófunarefnið hefur oxunareiginleika. Ef raunin er önnur skal gera heildarprófun á efninu.

Í heildarprófun er prófunarefnið blandað með skilgreindu, brennanlegu efni í ýmsum hlutföllum. Þá er búin til lengja úr hverri blöndu og kveikt í öðrum enda lengjunnar. Sá hámarksbrunahraði, sem þannig er ákvarðaður, er borinn saman við hámarksbrunahraða viðmiðunarblöndunnar.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ef þörf krefur má nota hvaða aðferð sem vera skal við mölun og blöndun, að því tilskildu að hámarksbrunahraði í sex aðskildum prófunum víki ekki meira en 10% frá reiknuðu meðalgildi.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

1.6.1.1. *Prófunarefni*

Prófunarsýnið er mulið, þar til agnastærðin er < 0,125 m, samkvæmt eftirfarandi verkferli: prófunarefnið er sigtað, skammturinn sem er eftir er mulinn og þetta verkferli er endurtekið þar til allur prófunar-skammturinn hefur farið í gegnum sigtið.

Nota má hvaða aðferð sem vera skal við mölun og sigtun svo fremi að hún uppfylli gæðaviðmiðanir.

Áður en blandan er útbúin er efnið þurrkað við 105 °C uns stöðugri þyngd er náð. Ef niðurbrotshitastig prófunarefnisins er lægra en 105 °C verður að þurrka efnið við hæfilegan, lægri hita.

1.6.1.2. *Brennanlegt efni*

Beðmiduft er notað sem brennanlegt efni. Beðmið skal vera af þeirri tegund sem er notuð við þunnlagsskiljun eða súluskiljun. Það hefur reynst hentugt að nota tegund þar sem meira en 85% trefjanna eru milli 0,020 og 0,075 mm að lengd. Beðmiduftið er sigtað í gegnum sigti með 0,125 mm möskvum. Nota skal sömu framleiðslulotu beðmis í allri prófuninni.

Áður en blandan er útbúin er beðmiduftið þurrkað við 105 °C uns stöðugri þyngd er náð.

Ef viðarmjöl er notað í forprófuninni skal útbúa viðarmjöl úr mjúkviði með því að safna þeim skammti sem kemst í gegnum sigti með 1,6 mm möskvum, blanda vandlega og þurrka við 105 °C í fjórar klukkustundir í lagi sem er ekki meira en 25 mm að þykkt . Þá er mjölið kælt og geymt í loftþéttu íláti, sem er fyllt eins og hægt er, þar til mjölið er notað, helst innan 24 klukkustunda frá þurrkun.

1.6.1.3. *Íkveikjugjafi*

Heitur gaslogi úr gasbrennara (sem er a.m.k. 5 mm að þvermáli) er notaður til íkveikju. Ef annar íkveikjugjafi er notaður (t.d. þegar prófað er í óhvarfgjörnu andrúmslofti) skal gefa lýsingu á honum í skýrslunni og færa rök fyrir notkun hans.

1.6.2. **Framkvæmd prófunarinnar**

Athugasemd:

Fara skal með blöndur oxara og beðmis sem hugsanlega sprengifimar og meðhöndla þær með tilhlýðilegri varúð.

1.6.2.1. *Forprófun*

Þurrkaða efnið er blandað rækilega með þurrkuðu beðmi eða viðarmjöli í hlutföllunum 2 skammtar af prófunarefni á móti 1 skammti af beðmi eða viðarmjöli, miðað við þyngd, og blandan er mótuð í lítinn hrauk sem er 3,5 cm (þvermál grunns) × 2,5 cm (hæð) með því að fylla keilulaga mót án þess að þjappa (t.d. rannsóknarstofutrekt úr gleri þar sem lokað hefur verið fyrir mjórri endann).

Hraukurinn er settur á kalda, eldtrausta, ógropna grunnplötu með litla varmaleiðni. Prófunin skal gerð í súgskápi eins og mælt er fyrir um í 1.6.2.2.

Íkveikjugjafinn er látinn snerta hraukinn. Fylgst er með krafti og lengd efnahvarfsins, sem verður, og það skráð.

Efnið skal talið oxandi ef efnahvarfið er kröftugt.

Þegar niðurstaðan er vafa undirorpin er jafnan nauðsynlegt að gera fullkomna útbreiðsluprófun eins og lýst er hér á eftir.

1.6.2.2. *Útbreiðsluprófun*

Útbúnar eru blöndur af oxara og beðmi sem innihalda frá 10–90% af oxara, miðað við þyngd, og skal munur milli þrepa vera 10% miðað við þyngd. Í vafatilvikum skal nota blöndur oxara og beðmis sem liggja þarna á milli til að finna hámarksbrunahraða með meiri nákvæmni.

Notað er mót til að móta lengjuna. Mótið er gert úr málmi, er 250 mm langt með þríhyrndu þversniði sem er 10 mm hátt og 20 mm breitt að innra máli. Á báðar langhliðar mótsins er fest málmplata sem gegnir hlutverki hliðarskorðu og skagar 2 mm upp yfir efri brún þríhyrnda þversniðsins (mynd). Í þetta mót er blandan sett óþjöppuð í aðeins of miklu magni. Eftir að mótið hefur verið látið falla einu sinni úr 2 cm hæð

á fastan flöt er umframmagnið, sem eftir er, skafið af með skásettri þynnu. Þá eru hliðarskorðurnar fjarlægðar og duftið sem eftir er er sléttað með kefli. Eldtraust, ógropin plata með lítilli varmaleiðni er sett ofan á mótið, búnaðinum hvolft og mótið fjarlægt.

Efnislengjunni er komið fyrir í súgskápi þvert á loftstrauminn.

Lofthraðinn skal vera nægilega mikill til að gufur komist ekki út í rannsóknarstofuna og honum skal ekki breyta meðan á prófun stendur. Setja skal dragsúgshlíf í kringum búnaðinn.

Þar eð beðmi og sum efnin, sem prófa skal, eru rakadræg skal framkvæma prófunina eins hratt og unnt er.

Kveikt er í öðrum enda lengjunnar með því að bera loga að henni.

Eftir að hvarfsvæðið hefur hreyfst um 30 mm skal mæla hraða útbreiðslunnar á næstu 200 mm.

Prófunin er gerð á viðmiðunarefninu og minnst einu sinni á hverri blöndu prófunarefnis og beðmi.

Ef í ljós kemur að hámarksbrunahraðinn er hærri en hjá viðmiðunarefninu svo marktækt sé má hætta prófun en að öðrum kosti skal endurtaka prófunina fimm sinnum á hverri af þeim þremur blöndum sem hafa mesta brunahraða.

Ef grunur er um að niðurstaðan sé falsjákvæð skal endurtaka prófunina með hvarftregu efni með svipaða agnastærð, s.s. sem kísilgúr, í stað beðmis. Einnig má endurprófa þá blöndu prófunarefnis- og beðmis, sem hefur mestan brunahraða, í hvarftregu lofti (< 2% súrefnisinnihald miðað við rúmmál).

2. **GÖGN**

Af öryggisástæðum telst hámarksbrunahraði, ekki meðalgildið, vera einkennandi oxunareiginleiki efnisins sem verið er að prófa.

Hæsta gildi brunahraða úr keyrslu sex prófana á tiltekinni blöndu er það sem skiptir máli í matinu.

Teiknað er línurit af hæsta gildi brunahraða hverrar blöndu sem fall af styrk oxarans í henni. Hámarks-brunahraðinn er lesinn af línuritinu.

Frávik sex mældra gilda, úr einni prófunarkeyrslu, fyrir brunahraða í blöndunni, sem hefur mesta brunahraðann, má ekki vera meira en 10% frá reiknuðu meðalgildi, að öðrum kosti verður að bæta aðferðir við mölun og blöndun.

Hámarksbrunahraðinn sem mælist er borinn saman við hámarksbrunahraða viðmiðunarblöndunnar (sjá 1.3).

Ef prófanir eru gerðar í hvarftregu lofti er hámarkshvarfhraðinn borinn saman við hámarkshvarfhraða viðmiðunarblöndunnar í hvarftregu lofti.

3. **SKÝRSLA**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— auðkenni prófunarefnisins, samsetning, hreinleiki, rakainnihald o.s.frv.,

— hvers kyns meðhöndlun prófunarsýnisins (t.d. mölun eða þurrkun),

— kveikjugjafinn sem notaður var við prófanirnar,

— niðurstöður mælinga,

— gerð hvarfsins (t.d. bruni með blossa á yfirborðinu, bruni í gegnum allan efnismassann, upplýsingar um myndefni frá bruna o.s.frv.),

— allar frekari athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, þ.m.t. lýsing á krafti hvarfsins (logar, neistar, reykur, hægur glóðarbruni o.s.frv.) og áætluð tímalengd þess samkvæmt öryggis-forprófuninni/forskimunarprófuninni fyrir bæði prófunar- og viðmiðunarefnið,

— niðurstöður úr prófunum með hvarftregu efni ef slíkar prófanir fóru fram,

— niðurstöður úr prófunum í hvarftregu lofti ef slíkar prófanir fóru fram.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Efni telst oxandi ef:

a) kröftugt hvarf verður í forprófuninni,

b) hámarksbrunahraði prófunarblandna í heildarprófuninni er meiri en eða jafn hámarksbrunahraða viðmiðunarblöndu af beðmi og baríumnítrati.

Til að komast hjá falsjákvæðum niðurstöðum skal, við túlkun niðurstaðna, einnig taka til greina niðurstöðurnar sem fengust við prófun efnisins með hvarftregu efni og/eða við prófun í hvarftregu lofti.

4. **HEIMILDIR**

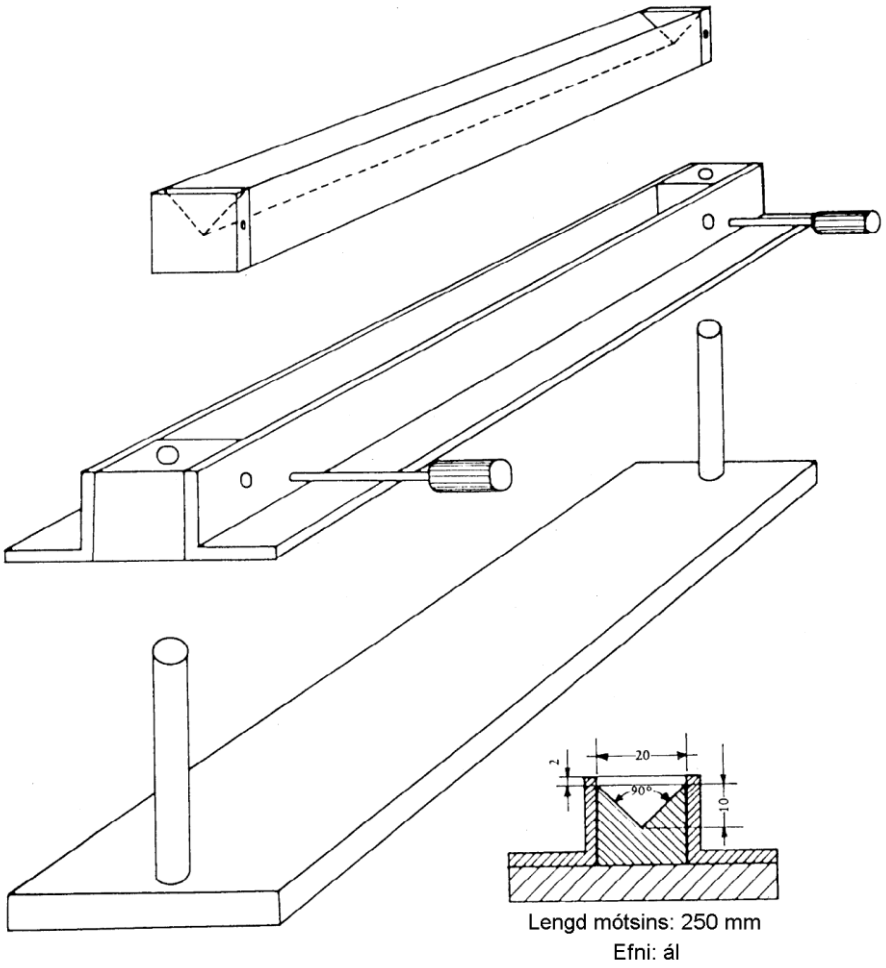
NF T 20-035 (September 85) Chemical products for industrial use. Determination of the oxidising properties of solids.

Viðbætir

Mynd

Mót og fylgihlutir til að útbúa lengjuna

(Öll mál eru í mm)



A.18. MEÐALSAMEINDAÞYNGD OG SAMEINDAÞYNGDARDREIFING FJÖLLIÐNA

1. AÐFERÐ

Þessi gegndræpisskiljun er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 118 um prófanir (1996). Meginreglurnar og frekari tæknilegar upplýsingar er að finna í 1. heimild.

1.1. INNGANGUR

Sökum þess hve eiginleikar fjölliðna eru breytilegir er ógerningur að lýsa einni aðferð þar sem sett eru fram nákvæm skilyrði fyrir skiljun og mati sem taka til allra hugsanlegra sértilvika sem geta komið fram við skiljun fjölliðna. Einkum hentar oft illa að beita gegndræpisskiljun þegar um flóknar fjölliður er að ræða. Ef gegndræpisskiljun verður ekki við komið má ákvarða sameindaþyngd með öðrum aðferðum (sjá viðbæti). Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem er notuð og rökstyðja notkun hennar.

Aðferðin, sem lýst er hér, byggist á DIN-staðli 55672 (1. heimild). Ítarlegar upplýsingar um framkvæmd tilrauna og hvernig meta á gögnin er að finna í þessum DIN-staðli. Ef nauðsynlegt er að breyta skilyrðum í tilraununum skal færa rök fyrir þeim breytingum sem gerðar eru. Nota má aðra staðla ef nákvæmar tilvísanir til þeirra eru gefnar. Aðferðin, sem er lýst, byggist á því að nota pólýstýrensýni með þekktri fjöldreifni (e. *polydispersity*) til að kvarða og vera má að breyta þurfi aðferðinni svo að hún henti fyrir tilteknar fjölliður, t.d. vatnsleysanlegar fjölliður og fjölliður með löngum og greinóttum keðjum.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Meðalsameindaþyngd, M_n, og massavegin sameindaþyngd, M_w, eru ákvarðaðar með eftirfarandi jöfnum:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

þar sem:

H_i er útslag nemans frá grunnlínunni fyrir rásrúmmálið V_i

M_i er sameindaþyngd fjölliðuþáttarins við rásrúmmálið V_i og n er fjöldi gagnapunkta.

Breidd sameindaþyngdardreifingarinnar, sem er mælikvarði á dreifni (e. *dispersity*) kerfisins, er gefin með hlutfallinu M_w/M_n.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Þar eð gegndræpisskiljun er afstæð aðferð verður að framkvæma kvörðun. Í þessu skyni er venjulega notaður línulegur staðall með ógreinóttum pólýstýrenkeðjum með þekktum meðalsameindaþyngdum fyrir M_n og M_w og þekktri sameindaþyngdardreifingu á þröngu bili. Kvörðunarferilinn má eingöngu nota til að ákvarða sameindaþyngd óþekkta sýnisins ef valin hafa verið sömu skilyrði við aðgreiningu sýnisins og staðlanna.

Ákvörðuð vensl milli sameindaþyngdarinnar og skolrúmmálsins gilda einungis fyrir þau sértæku skilyrði sem ríkja í tiltekinni tilraun. Skilyrðin varða fyrst og fremst hitastigið, leysinn (eða leysablönduna), aðstæður við litskiljunina, skiljusúluna eða skiljusúlnakerfið.

Gildin, sem fást þegar sameindaþyngdir sýnisins eru ákvarðaðar á þennan hátt, eru afstæð og nefnast „pólýstýrenjafngildar sameindaþyngdir“. Þetta merkir að mæld gildi fyrir sameindaþyngdir geta vikið meira eða minna frá algildunum og ræðst það af byggingarlegum og efnafræðilegum mun á sýninu og stöðlunum. Ef aðrir staðlar eru notaðir, t.d. pólýetýlenglýkól, pólýetýlenoxíð, pólýmetýlmetakrýlat eða pólýakrýlsýra, skal tilgreina ástæður þess.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ákvarða má bæði sameindaþyngdardreifingu sýnisins og meðalsameindaþyngdir (M_n og M_w) með því að beita gegndræpisskiljun. Gegndræpisskiljun er sérstök tegund vökvaskiljunar þar sem mismunandi efnisþættir sýnisins eru aðskildir í samræmi við straumfræðilegt rúmmál hvers þeirra (2. heimild).

Skiljunin á sér stað meðan sýnið fer gegnum súlu sem er fyllt gropnu efni, yfirleitt lífrænu geli. Smáar sameindir geta smogið gegnum gropurnar en stórar sameindir ekki. Stóru sameindirnar berast því styttri veg og þær skolast út fyrst. Miðlungi stórar sameindir berast gegnum sumar gropurnar og skolast út síðar. Smæstu sameindirnar, sem hafa minni straumfræðilegan geisla en gropurnar í gelinu, smjúga gegnum allar gropurnar. Þessar sameindir skolast út síðast.

Við kjöraðstæður ræðst skiljunin að öllu leyti af stærð sameindanna en í reynd er erfitt að komast hjá því að einhver truflun verði vegna ásogs. Ójöfn fylling í súlunum og dauðarúmmál geta aukið á truflunina (2. heimild).

Greiningin byggist m.a. á brotstuðli eða útblámagleypni og gefur einfaldan dreifingarferil. Til að geta ráðið í raunveruleg sameindaþyngdargildi út frá ferlinum er nauðsynlegt að kvarða súluna með því að láta fjölliður, sem hafa þekkta sameindaþyngd og helst u.þ.b. sömu byggingu, t.d. mismunandi pólýstýrenstaðla, fara gegnum súluna. Yfirleitt fæst normalferill (e. *Gaussian curve*), sem er stundum dreginn út í stuttan hala á þeirri hlið sem sameindaþyngdin er minni, og lóðrétti ásinn gefur til kynna magn (út frá þyngd) sameinda með mismunandi sameindaþyngd sem skolast út og láréttti ásinn sýnir logrann af sameindaþyngdinni.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Endurtekningarnákvæmni (hlutfallslegt staðalfrávik) skolrúmmálsins skal vera meiri en sem nemur 0,3%. Tryggja skal tilskilda endurtekningarnákvæmni efnagreiningarinnar með leiðréttingu með innri staðli ef skiljurit er metið á grundvelli tíma og uppfyllir ekki framangreinda viðmiðun (1. heimild). Fjöldreifnin er komin undir sameindaþyngd staðlanna. Ef um pólýstýrenstaðla er að ræða eru eftirfarandi gildi dæmigerð:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p er sameindaþyngd staðalsins við hæsta toppgildið)

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Tilreiðsla staðallausna með pólýstýreni**

Pólýstýrenstaðlarnir eru leystir upp með því að blanda þeim vandlega saman við þann skiljuvökva sem valinn hefur verið. Við tilreiðslu lausnanna skal þess gætt að farið sé eftir leiðbeiningum framleiðandans.

Styrkur þeirra staðla, sem valdir eru, ræðst af ýmsum þáttum, t.d. inngjafarrúmmáli, seigju lausnarinnar og næmi nemans sem notaður er við greininguna. Stilla verður mesta inngjafarrúmmál eftir lengd súlunnar til þess að forðast yfirálag. Dæmigert inngjafarrúmmál við aðgreiningar efna, þar sem notuð er gegndræpis-skiljun með 30 cm × 7,8 mm súlu, er yfirleitt frá 40 og upp í 100 µl. Nota má stærra rúmmál en það ætti þó aldrei að fara yfir 250 µl. Ákvarða verður kjörhlutfallið milli inngjafarrúmmáls og styrks áður en kemur að eiginlegri kvörðun súlunnar.

1.6.2. **Tilreiðsla sýnislausnarinnar**

Í meginatriðum gilda framangreindar kröfur einnig um tilreiðslu sýnislausna. Sýnið er leyst upp í heppilegum leysi, t.d. tetrahýdrófúrani (THF), með því að hrista lausnina vandlega. Ekki ætti undir neinum kringumstæðum að leysa sýnið upp með því að nota úthljóðsbað. Ef nauðsyn krefur skal hreinsa sýnislausnina með himnusíu sem hefur opstærð á bilinu 0,2–2,0 µm.

Greina verður frá tilvist óuppleystra agna í lokaskýrslunni þar eð þær geta stafað af sameindum með mikla sameindaþyngd. Nota skal viðeigandi aðferð til að ákvarða hundraðshluta óuppleystra agna miðað við þyngd. Lausnirnar skulu notaðar innan 24 klukkustunda.

1.6.3. **Búnaður**

— ílát undir leysiefni,

— afgösunarbúnaður (þar sem við á),

— dæla,

— púlsjafnari (þar sem við á),

— inngjafarkerfi,

— skiljusúlur,

— nemi,

— rennslismælir (þar sem við á),

— riti og gagnavinnslubúnaður,

— ílát undir úrgang.

Tryggja verður að gegndræpisskiljunarkerfið sé hvarftregt gagnvart þeim leysum sem eru notaðir (t.d. með því að nota hárpípur úr stáli fyrir tetrahýdrófúran).

1.6.4. **Inngjöf sýnis og leysisinndælingarbúnaður**

Tiltekið rúmmál sýnislausnar er sett á súluna, annaðhvort með sjálfvirkum sýnatakara eða handvirkt, í skarpt afmarkaðri innspýtingu. Breyting getur orðið á mældri sameindaþyngdardreifingu við handvirka inngjöf ef bullan í sprautunni er dregin of hratt til baka eða ýtt of hratt fram. Leysisinngjafarkerfið ætti, eftir því sem við verður komið, að vera laust við púlsa og helst að vera búið púlsjafnara. Rennslishraðinn ætti að vera um 1 ml/mín.

1.6.5. **Súla**

Fjölliðan er skilgreind með því að nota annaðhvort eina súlu eða nokkrar raðtengdar súlur eftir því hvers eðlis sýnið er. Á markaði er til fjöldi gropinna súluefna með skilgreinda eiginleika (t.d. opstærð og hindrunarmörk). Val á skiljugeli eða lengd súlunnar ræðst bæði af eiginleikum sýnisins (straumfræðilegu rúmmáli og sameindaþyngdardreifingu) og sérstökum skilyrðum við skiljunina, t.d. skilyrðum sem varða leysiefni, hita og rennslishraða (1.–3. heimild).

1.6.6. **Fræðilegir botnar**

Lýsa skal súlunni eða súlnasamsetningunni, sem er notuð við skiljunina, með því að tilgreina fjölda fræðilegra botna. Þetta felur í sér að þegar tetrahýdrófúran er skolleysir er lausn etýlbensens eða annars viðeigandi, óskautaðs efnis sett á súlu með þekktri lengd. Fjöldi fræðilegra botna er gefinn með eftirfarandi jöfnu:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{eða} \quad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

þar sem:

N = fjöldi fræðilegra botna

V_e = skolrúmmálið við hæsta toppgildið

W = breidd toppsins við grunnlínuna

$W_{1/2}$ = breidd toppsins í hálfri hæð.

1.6.7. **Skiljunargeta (e. *separation efficiency*)**

Auk fjölda fræðilegra botna, sem er stærð sem ákvarðar bandbreiddina, skiptir skiljunargetan, sem ákvarðast af bratta kvörðunarferilsins, einnig máli. Skiljunargeta súlu er gefin með eftirfarandi venslum:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x}}{\text{þversniðsflatarmál súlunnar}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

þar sem:

V_e, M_x = skolrúmmálið fyrir pólýstýren með sameindaþyngdinni M_x
$V_{e,(10.Mx)}$ = skolrúmmálið fyrir pólýstýren með tíu sinnum meiri sameindaþyngd

Upplausn kerfisins er venjulega skilgreind sem hér segir:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

þar sem:log

V_{e1}, V_{e2} = skolrúmmál pólýstýrenstaðlanna tveggja við hæsta toppgildið
W_1, W_2 = breidd toppanna við grunnlínu
M_1, M_2 = sameindaþyngdirnar við hæsta toppgildið (munur á gildunum ætti að vera tífaldur).

R-gildið fyrir súlukerfið ætti að vera hærra en 1,7 (4. heimild).

1.6.8. **Leysar**

Allir leysar skulu vera mjög hrein efni (hreinleiki tetrahýdrófúrans skal vera 99,5%). Ílátið undir leysiefnið (ef þörf krefur umlukið óhvarfgjarnri lofttegund) verður að vera svo stórt að hægt sé að kvarða súluna og greina nokkur sýni. Eyða verður öllum lofttegundum úr leysinum áður en honum er dælt áfram til súlunnar.

1.6.9. **Hitastýring**

Hitastig í veigamiklum, innri hlutum búnaðarins (inngjafarlykkju, súlum, nema og leiðslum) skal vera stöðugt og hæfa þeim leysi sem valinn er hverju sinni.

1.6.10. **Nemi**

Hlutverk nemans er að skrá töluleg gildi fyrir styrk sýnis sem skolast út frá súlunni. Til að forðast óþarfa breikkun toppa skal rúmtak kúvettunnar í nemanum vera svo lítið sem framast er hægt að komast af með. Rúmtak kúvettunnar ætti ekki að vera meira en 10 µl nema þegar um er að ræða ljósdreifingar- og seigjunema. Við greininguna er venjulega beitt mismunarljósbrotsmælingu. Ef sérstakir eiginleikar sýnisins eða skolleysisins krefjast þess má hins vegar nota aðrar gerðir nema, t.d. nema fyrir útfjólublátt/sýnilegt ljós, nema fyrir innrautt ljós eða seigjunema.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

2.1. GÖGN

Nota skal DIN-staðalinn (1. heimild) að því er varðar ítarlegar matsviðmiðanir svo og þær kröfur sem varða söfnun og úrvinnslu gagna.

Tvær óháðar tilraunir skulu gerðar fyrir hvert sýni. Niðurstöðurnar skulu greindar úr hvorri tilraun fyrir sig.

Gildin fyrir M_n, M_w, M_w/M_n og M_p skulu tilgreind í hverri mælingu. Nauðsynlegt er að tilgreina skilmerkilega að mæld gildi séu hlutfallsleg gildi sem svara til sameindaþyngdar þess staðals sem er notaður.

Að lokinni ákvörðun á mismunandi rásrúmmáli eða rástímum (e.t.v. leiðrétt með innri staðli) skal setja gildin fyrir log M_p (M_p er hæsta toppgildi kvörðunarstaðalsins) á móti annarri þessara stærða. Nauðsynlegt er að hafa minnst tvo kvörðunarpunkta fyrir hvert tugbil fyrir sameindaþyngd og minnst fimm mælipunktar þurfa að vera á heildarferlinum og þeir ættu að spanna áætlaða sameindaþyngd sýnisins. Endapunkturinn, sem sýnir minnstu sameindaþyngd á kvörðunarferlinum, er skilgreindur með n-hexýl-benseni eða öðru viðeigandi, óskautuðu, uppleystu efni. Meðalsameindaþyngd og massavegin sameinda-þyngd eru yfirleitt ákvarðaðar með rafrænni gagnavinnslu sem byggist á formúlunum í lið 1.2. Ef handvirk úrvinnsla er notuð er hægt að styðjast við ASTM D 3536-91 (3. heimild).

Dreifingarferillinn skal birtur sem tafla eða sem mynd (tíðnidreifing eða summa hundraðshluta á móti log M). Í grafísku framsetningunni skal hvert tugbil fyrir sameindaþyngd að jafnaði vera um 4 cm á breidd og hæsta toppgildið skal vera í um 8 cm hæð. Ef um tegurdreifingarferla er að ræða skal munur á lóðhnitum milli 0–100% vera um 10 cm.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið (auðkenni, aukefni og óhreinindi),

— lýsing á meðhöndlun sýnisins, athuganir og vandamál.

2.2.2. **Tækjabúnaður**

— ílát undir skiljuvökva, óhvarfgjörn lofttegund, afgösun skiljuvökvans, samsetning skiljuvökvans, óhreinindi,

— dæla, púlsjafnari og inngjafarkerfi,

— skiljusúlur (framleiðandi, allar upplýsingar um eiginleika súlnanna, s.s opstærð, tegund skiljuefnis o.s.frv., og fjöldi, lengd og röð súlnanna sem eru notaðar),

— fjöldi fræðilegra botna súlunnar (eða súlnasamsetningarinnar), skiljunargeta (upplausn kerfisins),

— upplýsingar um samhverfu toppanna,

— hitastig súlnanna, tegund hitastýringar,

— nemi (mælingaraðferð, tegund, rúmmál kúvettunnar),

— rennslismælir, ef hann er notaður (framleiðandi, mælingaraðferð),

— riti og gagnavinnslubúnaður (vél- og hugbúnaður).

2.2.3. **Kvörðun kerfisins**

— ítarleg lýsing á þeirri aðferð sem er notuð til að búa til kvörðunarferilinn,

— upplýsingar um gæðaviðmiðanir að því er varðar þessa aðferð (t.d. fylgnistuðull og fertölusumma frávika),

— upplýsingar um alla framreikninga, ályktanir og námundanir í tilraunaferlinu og við mat og úrvinnslu gagna,

— skylt er að skrá allar mælingar, sem gerðar eru til að búa til kvörðunarferilinn, í töflu þar sem fram koma eftirfarandi upplýsingar um hvern kvörðunarpunkt:

  — heiti sýnisins,

  — framleiðandi sýnisins,

  — einkennisgildi staðlanna M_p, M_n, M_w og M_w/M_n, eins og þau eru tilgreind af hálfu framleiðanda eða fundin með mælingum eftir á, ásamt nákvæmum upplýsingum um aðferðina sem er beitt við ákvörðunina,

  — inngjafarrúmmál og inngjafarstyrkur,

  — M_p-gildi sem er notað við kvörðun,

  — skolrúmmál eða leiðréttur rástími, mælt við hæsta toppgildið,

  — M_p-gildi sem er reiknað við hæsta toppgildið,

  — skekkja í reiknaða M_p-gildinu og kvörðunargildinu, í hundraðshlutum.

2.2.4. **Mat:**

— mat á grundvelli tíma: aðferðir sem eru notaðar til að tryggja tilskilda samanburðarnákvæmni (leiðréttingaraðferð, innri staðall o.s.frv.),

— upplýsingar um hvort matið er grundvallað á skolrúmmálinu eða rástímanum,

— upplýsingar um viðmiðunarmörk matsins ef toppurinn hefur ekki verið greindur til fullnustu,

— lýsing á jöfnunaraðferðum, ef þær eru notaðar,

— aðferðir við að undirbúa og formeðhöndla sýnið,

— tilvist óuppleystra agna, ef um þær er að ræða,

— inngjafarrúmmál (µl) og inngjafarstyrkur (mg/ml),

— athuganir sem benda til áhrifa sem orsaka frávik frá ákjósanlegasta sniðriti úr gegndræpisskiljun,

— ítarleg lýsing á öllum breytingum í prófunarferlunum,

— upplýsingar um skekkjusvið,

— allar aðrar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3. **HEIMILDIR**

1) DIN 55672(1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds., (1979) Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Viðbætir

Dæmi um aðrar aðferðir til að ákvarða meðalsameindaþyngd fyrir fjölliður (M_n)

Gegndræpisskiljun (GPC) er ákjósanlegasta aðferðin við ákvörðun á M_n, einkum þegar fáanleg er röð staðla sem eru sambærilegir að byggingu og fjölliðan. Ef erfitt er hins vegar að beita gegndræpisskiljun vegna örðugleika í framkvæmd eða ef þess er að vænta að efnið uppfylli ekki lögbundna viðmiðun fyrir M_n (sem þarf að staðfesta) má nota aðrar aðferðir, s.s:

1. **Aðferð sem styðst við safneiginleika**

1.1. Suðumarksmæling/frostmarksmæling

felst í mælingu á hækkun suðumarks (suðumarksmæling) eða lækkun frostmarks (frostmarksmæling) leysis þegar fjölliðu er bætt út í hann. Aðferðin grundvallast á þeirri staðreynd að áhrif uppleystu fjölliðunnar á suðu- eða frostmark vökvans eru komin undir sameindaþyngd fjölliðunnar (1.–2. heimild).

Notkunarsvið, M_n < 20 000.

1.2. Lækkun gufuþrýstings

felst í mælingu á gufuþrýstingi tiltekins viðmiðunarvökva fyrir og eftir að í hann hefur verið bætt þekktu magni af fjölliðu (1. og 2. heimild).

Notkunarsvið, M_n < 20 000 (fræðilegt, hefur takmarkað gildi í reynd).

1.3. Himnuosmósumæling

byggist á lögmálinu um osmósu, þ.e. náttúrulegri tilhneigingu leysissameinda til að fara í gegnum hálfgegndræpa himnu frá þynntri lausn yfir í aðra lausn með meiri styrk uns jafnvægi er komið á. Í prófuninni er styrkur þynntu lausnarinnar núll en sterkari lausnin inniheldur fjölliðuna. Þegar sameindir leysisins fara gegnum himnuna skapast þrýstingsmunur sem er kominn undir styrknum og sameindaþyngd fjölliðunnar (1., 3. og 4. heimild).

Notkunarsvið, M_n milli 20 000– 200 000.

1.4. Gufufasaosmósumæling

felst í samanburði á uppgufunarhraða úða af hreinum leysi við úða a.m.k. þriggja styrkblandna af fjölliðunni (1. 2. og 4. heimild).

Notkunarsvið, M_n < 20 000.

2. **Endahópagreining**

Til að nota þessa aðferð er nauðsynlegt að þekkja bæði heildarbyggingu fjölliðunnar og eðli endahópa keðjunnar (sem verður að vera hægt að greina frá meginkeðjunni, t.d. með segulómun (NMR), títrun eða afleiðumyndun). Ákvörðun á sameindastyrk endahópa fjölliðunnar getur gefið gildi fyrir sameinda-þyngdina (7.–9. heimild).

Notkunarsvið, M_n allt að 50 000 (með minnkandi áreiðanleika)

3. **Heimildir**

1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984) Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

2) Glover, C.A., (1975) Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

3) ASTM D 3750-79, (1979) Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) Coll, H. (1989) Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, bls. 25-52.

5) ASTM 3592-77, (1977) Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

6) Morris, C.E.M., (1989) Vapour Pressure Osmometry. In: Determinationn of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989) Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

8) Garmon, R.G., (1975) End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

9) Amiya, S., et al. (1990) Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

A.19. INNIHALD SAMEINDA MEÐ LITLA SAMEINDAÞYNGD Í FJÖLLIÐUM

1. AÐFERÐ

Þessi gegndræpisskiljun er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 119 um prófanir (1996). Meginreglurnar og frekari tæknilegar upplýsingar er að finna í heimildunum sem vísað er til.

1.1. INNGANGUR

Sökum þess hve eiginleikar fjölliðna eru breytilegir er ógerningur að lýsa einni aðferð þar sem sett eru fram nákvæm skilyrði fyrir skiljun og mati sem taka til allra hugsanlegra sértilvika sem geta komið fram við skiljun fjölliðna. Einkum hentar oft illa að beita gegndræpisskiljun þegar um flóknar fjölliður er að ræða. Ef gegndræpisskiljun verður ekki við komið má ákvarða sameindaþyngd með öðrum aðferðum (sjá viðbæti). Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem er notuð og rökstyðja notkun hennar.

Aðferðin, sem er lýst, byggist á DIN-staðli 55672 (1. heimild). Ítarlegar upplýsingar um framkvæmd tilrauna og hvernig meta á gögnin er að finna í þessum DIN-staðli. Ef nauðsynlegt er að breyta skilyrðum í tilraununum skal færa rök fyrir þeim breytingum sem gerðar eru. Nota má aðra staðla ef nákvæmar tilvísanir til þeirra eru gefnar. Aðferðin, sem er lýst, byggist á því að nota pólýstýrensýni með þekktri fjöldreifni (e. *polydispersity*) til að kvarða og vera má að breyta þurfi aðferðinni svo að hún henti fyrir tilteknar fjölliður, t.d. vatnsleysanlegar fjölliður og fjölliður með löngum og greinóttum keðjum.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Lítil sameindaþyngd er samkvæmt skilgreiningu sameindaþyngd undir 1000 daltonum.

Meðalsameindaþyngd, M_n, og massavegin meðalsameindaþyngd, M_w, eru ákvarðaðar með eftirfarandi jöfnum:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i / M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

þar sem:

H_i = útslag nemans frá grunnlínunni fyrir rásrúmmálið V_i,
M_i = sameindaþyngd fjölliðuþáttarins við rásrúmmálið V_i og n er fjöldi gagnapunkta.

Breidd sameindaþyngdardreifingarinnar, sem er mælikvarði á dreifni (e. *dispersity*) kerfisins, er gefin með hlutfallinu M_w/M_n.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Þar eð gegndræpisskiljun er afstæð aðferð verður að framkvæma kvörðun. Í þessu skyni er venjulega notaður línulegur staðall með ógreinóttum pólýstýrenkeðjum með þekktum meðalsameindaþyngdum fyrir M_n og M_w og þekktri sameindaþyngdardreifingu á þröngu bili. Kvörðunarferilinn má eingöngu nota til að ákvarða sameindaþyngd óþekkta sýnisins ef valin hafa verið sömu skilyrði við aðgreiningu sýnisins og staðlanna.

Ákvörðuð vensl milli sameindaþyngdarinnar og skolrúmmálsins gilda einungis fyrir þau sértæku skilyrði sem ríkja í tiltekinni tilraun. Skilyrðin varða fyrst og fremst hitastigið, leysiefnið (eða leysablönduna), aðstæður við litskiljunina og skiljusúluna eða skiljusúlnakerfið.

Gildin, sem fást þegar sameindaþyngdir sýnisins eru ákvarðaðar á þennan hátt, eru afstæð og nefnast „pólýstýrenjafngildar sameindaþyngdir“. Þetta merkir að mæld gildi fyrir sameindaþyngdir geta vikið meira eða minna frá algildunum og ræðst það af byggingarlegum og efnafræðilegum mun á sýninu og stöðlunum. Ef aðrir staðlar eru notaðir, t.d. pólýetýlenglýkól, pólýetýlenoxíð, pólýmetýlmetakrýlat eða pólýakrýlsýra, skal tilgreina ástæður þess.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ákvarða má bæði sameindaþyngdardreifingu sýnisins og meðalsameindaþyngdir (M_n og M_w) með því að beita gegndræpisskiljun. Gegndræpisskiljun er sérstök tegund vökvaskiljunar þar sem mismunandi efnisþættir sýnisins eru aðskildir í samræmi við straumfræðilegt rúmmál hvers þeirra (2. heimild).

Skiljunin á sér stað meðan sýnið fer gegnum súlu sem er fyllt gropnu efni, yfirleitt lífrænu geli. Smáar sameindir geta smogið gegnum gropurnar en stórar sameindir ekki. Stóru sameindirnar berast því styttri veg og þær skolast út fyrst. Miðlungi stórar sameindir berast gegnum sumar gropurnar og skolast út síðar. Smæstu sameindirnar, sem hafa minni straumfræðilegan geisla en gropurnar í gelinu, smjúga gegnum allar gropurnar. Þessar sameindir skolast út síðast.

Við kjöraðstæður ræðst skiljunin að öllu leyti af stærð sameindanna en í reynd er erfitt að komast hjá því að einhver truflun verði vegna ásogs. Ójöfn fylling í súlunum og dauðarúmmál geta aukið á truflunina (2. heimild).

Greiningin byggist m.a. á brotstuðli eða útblámagleypni og gefur einfaldan dreifingarferil. Til að geta ráðið í raunveruleg sameindaþyngdargildi út frá ferlinum er nauðsynlegt að kvarða súluna með því að láta fjölliður, sem hafa þekkta sameindaþyngd og helst u.þ.b. sömu byggingu, t.d. mismunandi pólýstýrenstaðla, fara gegnum súluna. Yfirleitt fæst normalferill (e. *Gaussian curve*), sem er stundum dreginn út í stuttan hala á þeirri hlið sem sameindaþyngdin er minni, og lóðrétti ásinn gefur til kynna magn (út frá þyngd) sameinda með mismunandi sameindaþyngd sem skolast út og lárétti ásinn sýnir logrann af sameinda-þyngdinni.

Innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd er fundið út frá þessum ferli. Útreikningarnir geta því aðeins verið nákvæmir að innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd jafngildi massa fjölliðunnar í heild.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Endurtekningarnákvæmni (hlutfallslegt staðalfrávik) skolrúmmálsins skal vera meiri en sem nemur 0,3%. Tryggja skal tilskilda endurtekningarnákvæmni efnagreiningarinnar með leiðréttingu með innri staðli ef skiljurit er metið á grundvelli tíma og uppfyllir ekki framangreinda viðmiðun (1. heimild). Fjöldreifnin er komin undir sameindaþyngd staðlanna. Ef um pólýstýrenstaðla er að ræða eru eftirfarandi gildi dæmigerð:

$M_p < 2000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2000 \leq Mp \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

(M_p er sameindaþyngd staðalsins við hæsta toppgildið)

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Tilreiðsla staðallausna með pólýstýreni**

Pólýstýrenstaðlarnir eru leystir upp með því að blanda þeim vandlega saman við þann skiljuvökva sem valinn hefur verið. Við tilreiðslu lausnanna skal þess gætt að farið sé eftir leiðbeiningum framleiðandans.

Styrkur þeirra staðla, sem valdir eru, ræðst af ýmsum þáttum, t.d. inngjafarrúmmáli, seigju lausnarinnar og næmi nemans sem notaður er við greininguna. Stilla verður mesta inngjafarrúmmál eftir lengd súlunnar til þess að forðast yfirálag. Dæmigert inngjafarrúmmál við greiningarskiljun, þar sem notuð er gegnd-ræpisskiljun með 30 cm × 7,8 mm súlu, er venjulega milli 40–100 µl. Nota má stærra rúmmál en það ætti þó aldrei að fara yfir 250 µl. Ákvarða verður kjörhlutfallið milli inngjafarrúmmáls og styrks áður en kemur að eiginlegri kvörðun súlunnar.

1.6.2. **Tilreiðsla sýnislausnarinnar**

Í meginatriðum gilda framangreindar kröfur einnig um tilreiðslu sýnislausna. Sýnið er leyst upp í heppilegum leysi, t.d. tetrahýdrófúrani (THF), með því að hrista lausnina vandlega. Ekki ætti undir neinum kringumstæðum að leysa sýnið upp með því að nota úthljóðsbað. Ef nauðsyn krefur skal hreinsa sýnislausnina með himnusíu sem hefur opstærð á bilinu 0,2–2,0 µm.

Greina verður frá tilvist óuppleystra agna í lokaskýrslunni þar eð þær geta stafað af sameindum með mikla sameindaþyngd. Nota skal viðeigandi aðferð til að ákvarða hundraðshluta óuppleystra agna miðað við þyngd. Lausnirnar skulu notaðar innan 24 klukkustunda.

1.6.3. **Leiðrétting vegna innihalds óhreininda og aukefna**

Leiðrétting fyrir innihald efnisþátta með M < 1000, vegna hlutdeildar sérstakra efnisþátta sem eru ekki fjölliður (t.d. óhreininda og/eða aukefna), er að jafnaði nauðsynleg nema mælingar hafi þegar sýnt að innihald þeirra er < 1%. Upplýsingar um þetta fást með beinni greiningu á fjölliðulausninni eða skolvökvanum í gegndræpisskiljuninni.

Ef styrkur skolvökvans, eftir að hann hefur farið gegnum súluna, er svo lítill að frekari greiningu verður ekki við komið skal auka styrk hans. Vera má að nauðsynlegt sé að láta skolvökvann gufa algerlega upp og leysa upp á ný það sem eftir verður. Styrking skolvökvans verður að gerast við þau skilyrði að tryggt sé að engar breytingar eigi sér stað í honum. Meðhöndlun skolvökvans að lokinni gegndræpisskiljuninni ræðst af því hvaða greiningaraðferð er beitt við magnákvörðunina.

1.6.4. **Búnaður**

Í gegndræpisbúnaðinum eru eftirfarandi íhlutir:

— ílát undir leysiefni,

— afgösunarbúnaður (þar sem við á),

— dæla,

— púlsjafnari (þar sem við á),

— inngjafarkerfi,

— skiljusúlur,

— nemi,

— rennslismælir (þar sem við á),

— riti og gagnavinnslubúnaður,

— ílát undir úrgang.

Tryggja verður að gegndræpisskiljunarkerfið sé hvarftregt gagnvart þeim leysum sem eru notaðir (t.d. með því að nota hárpípur úr stáli fyrir tetrahýdrófúran).

1.6.5. **Inngjöf sýnis og inndælingarbúnaður leysis**

Tiltekið rúmmál sýnislausnar er sett á súluna, annaðhvort með sjálfvirkum sýnatakara eða handvirkt, í skarpt afmarkaðri innspýtingu. Breyting getur orðið á mældri sameindaþyngdardreifingu við handvirka inngjöf ef bullan í sprautunni er dregin of hratt til baka eða ýtt of hratt fram. Leysisinngjafarkerfið ætti, eftir því sem við verður komið, að vera laust við púlsa og helst að vera búið púlsjafnara. Rennslishraðinn ætti að vera um 1 ml/mín.

1.6.6. **Súla**

Fjölliðan er skilgreind með því að nota annaðhvort eina súlu eða nokkrar raðtengdar súlur eftir því hvers eðlis sýnið er. Á markaði er til fjöldi gropinna súluefna með skilgreinda eiginleika (t.d. opstærð og hindrunarmörk). Val á skiljugeli eða lengd súlunnar ræðst bæði af eiginleikum sýnisins (straumfræðilegu rúmmáli og sameindaþyngdardreifingu) og sérstökum skilyrðum við skiljunina, t.d. skilyrðum sem varða leysiefni, hita og rennslishraða (1.–3. heimild).

1.6.7. **Fræðilegir botnar**

Lýsa skal súlunni eða súlnasamsetningunni, sem er notuð við skiljunina, með því að tilgreina fjölda fræðilegu botnanna. Þetta felur í sér að þegar tetrahýdrófúran er skolleysir er lausn etýlbensens eða annars viðeigandi, óskautaðs efnis sett á súlu með þekktri lengd. Fjöldi fræðilegra botna er gefinn með eftirfarandi jöfnu:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \quad \text{eða} \quad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

þar sem:

N = fjöldi fræðilegra botna
V_e = skolrúmmálið við hæsta toppgildið
W = er breidd toppsins við grunnlínuna
$W_{1/2}$ = er breidd toppsins í hálfri hæð.

1.6.8. **Skiljunargeta (e. *separation efficiency*)**

Auk fjölda fræðilegra botna, sem er stærð sem ákvarðar bandbreiddina, skiptir skiljunargetan, sem ákvarðast af bratta kvörðunarferilsins, einnig máli. Skiljunargeta súlu er gefin með eftirfarandi venslum:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{þversniðsflatarmál súlunnar}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

þar sem:

V_e, M_x = skolrúmmálið fyrir pólýstýren með sameindaþyngdinni M_x
$V_{e,(10.Mx)}$ = skolrúmmálið fyrir pólýstýren með tíu sinnum meiri sameindaþyngd

Upplausn kerfisins er venjulega skilgreind sem hér segir:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

þar sem:

V_{e1}, V_{e2} = skolrúmmál pólýstýrenstaðlanna tveggja við hæsta toppgildið
W_1, W_2 = gildi fyrir breidd toppanna við grunnlínu
M_1, M_2 = sameindaþyngdirnar við hæsta toppgildið (munur á gildunum ætti að vera tífaldur).

R-gildið fyrir súlukerfið á að vera hærra en 1,7 (4. heimild).

1.6.9. **Leysar**

Allir leysar skulu vera mjög hrein efni (hreinleiki tetrahýdrófúrans skal vera 99,5%). Ílátið undir leysiefnið (ef þörf krefur umlukið óhvarfgjarnri lofttegund) verður að vera svo stórt að hægt sé að kvarða súluna og greina nokkur sýni. Eyða verður öllum lofttegundum úr leysinum áður en honum er dælt áfram til súlunnar.

1.6.10. **Hitastýring**

Hitastig í veigamiklum, innri hlutum búnaðarins (inngjafarlykkju, súlum, nema og leiðslum) skal vera stöðugt og hæfa þeim leysi sem valinn er hverju sinni.

1.6.11. **Nemi**

Hlutverk nemans er að skrá töluleg gildi fyrir styrk sýnis sem skolast út frá súlunni. Til að forðast óþarfa breikkun toppa skal rúmtak kúvettunnar í nemanum vera svo lítið sem framast er hægt að komast af með.

Rúmtak kúvettunnar skal ekki vera meira en 10 µl nema þegar um er að ræða ljósdreifingar- og seigjunema. Við greininguna er venjulega beitt mismunarljósbrotsmælingu. Ef sérstakir eiginleikar sýnisins eða skolleysisins krefjast þess má hins vegar nota aðrar gerðir nema, t.d. nema fyrir útfjólublátt/sýnilegt ljós, nema fyrir innrautt ljós eða seigjunema.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

2.1. GÖGN

Nota skal DIN-staðalinn (1. heimild) að því er varðar ítarlegar matsviðmiðanir svo og þær kröfur sem varða söfnun og úrvinnslu gagna.

Tvær óháðar tilraunir skulu gerðar fyrir hvert sýni. Niðurstöðurnar skulu greindar úr hvorri tilraun fyrir sig. Í öllum tilvikum er mikilvægt að ákvarða einnig gögn fyrir blanksýni sem hafa verið meðhöndluð við sömu skilyrði og sýnið sjálft.

Nauðsynlegt er að tilgreina skilmerkilega að mæld gildi séu hlutfallsleg gildi sem svara til sameindaþyngda þess staðals sem er notaður.

Að lokinni ákvörðun á mismunandi rásrúmmáli eða rástímum (e.t.v. leiðrétt með innri staðli) skal setja gildin fyrir log M_p (M_p er hæsta toppgildi kvörðunarstaðalsins) á móti annarri þessara stærða. Nauðsynlegt er að hafa minnst tvo kvörðunarpunkta fyrir hvert tugbil fyrir sameindaþyngd og minnst fimm mælipunktar þurfa að vera á heildarferlinum og þeir ættu að spanna áætlaða sameindaþyngd sýnisins. Endapunkturinn, sem sýnir minnstu sameindaþyngd á kvörðunarferlinum, er skilgreindur með n-hexýlbenseni eða öðru viðeigandi, óskautuðu, uppleystu efni. Sá hluti ferilsins, sem svarar til sameindaþyngdar undir 1000, er ákvarðaður og leiðréttur með tilliti til óhreininda og aukefna. Skilju-línuritin eru að jafnaði metin með rafrænni gagnavinnslu. Ef handvirk úrvinnsla er notuð er hægt að styðjast við ASTM D 3536-91 (3. heimild).

Ef einhver óleysanleg fjölliða situr eftir á súlunni er líklegt að sameindaþyngd hennar sé meiri en leysanlega hlutans og ef ekki er tekið tillit til hennar yrði það til þess að sá hluti innihaldsins, sem hefur litla sameindaþyngd, yrði ofmetinn. Leiðbeiningar um leiðréttingu, að því er varðar innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd í óleysanlegri fjölliðu, eru gefnar í viðbætinum.

Dreifingarferillinn skal birtur sem tafla eða sem mynd (tíðnidreifing eða summa hundraðshluta á móti log M). Í grafísku framsetningunni skal hvert tugbil fyrir sameindaþyngd að jafnaði vera um 4 cm á breidd og hæsta toppgildið skal vera í um 8 cm hæð. Ef um tegurdreifingarferla er að ræða skal munur á lóðhnitum milli 0–100% vera um 10 cm.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið (auðkenni, aukefni og óhreinindi),

— lýsing á meðhöndlun sýnisins, athuganir og vandamál.

2.2.2. **Tækjabúnaður**

— ílát undir skiljuvökva, óhvarfgjörn lofttegund, afgösun skiljuvökvans, samsetning skiljuvökvans, óhreinindi,

— dæla, púlsjafnari og inngjafarkerfi,

— skiljusúlur (framleiðandi, allar upplýsingar um eiginleika súlnanna, s.s opstærð, tegund skiljuefnis o.s.frv., og fjöldi, lengd og röð súlnanna sem eru notaðar),

— fjöldi fræðilegra botna súlunnar (eða súlnasamsetningarinnar), skiljunargeta (upplausn kerfisins),

— upplýsingar um samhverfu toppanna,

— hitastig súlnanna, tegund hitastýringar,

— nemi (grundvöllur mæliaðferðar, tegund, rúmmál kúvettunnar),

— rennslismælir, ef hann er notaður (framleiðandi, mælingaraðferð),

— riti og gagnavinnslubúnaður (vél- og hugbúnaður).

2.2.3. **Kvörðun kerfisins**

— ítarleg lýsing á þeirri aðferð sem er notuð til að búa til kvörðunarferilinn,

— upplýsingar um gæðaviðmiðanir að því er varðar þessa aðferð (t.d. fylgnistuðull og fertölusumma frávika),

— upplýsingar um alla framreikninga, ályktanir og námundanir í tilraunaferlinu og við mat og úrvinnslu gagna,

— skylt er að skrá allar mælingar, sem gerðar eru til að búa til kvörðunarferilinn, í töflu þar sem fram koma eftirfarandi upplýsingar um hvern kvörðunarpunkt:

  — heiti sýnisins,

  — framleiðandi sýnisins,

  — einkennisgildi staðlanna M_p, M_n, M_w og M_w/M_n, eins og þau eru tilgreind af hálfu framleiðanda eða fundin með mælingum eftir á, ásamt nákvæmum upplýsingum um aðferðina sem er beitt við ákvörðunina,

  — inngjafarrúmmál og inngjafarstyrkur,

  — M_p-gildi sem er notað við kvörðun,

  — skolrúmmál eða leiðréttur rástími, mælt við hæsta toppgildið,

  — M_p-gildi sem er reiknað við hæsta toppgildið,

  — skekkja í reiknaða M_p-gildinu og kvörðunargildinu, í hundraðshlutum.

2.2.4. **Upplýsingar um innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd**

— lýsing á þeirri aðferð sem er notuð í greiningunni og framkvæmd tilraunanna,

— upplýsingar um hundraðshluta efnisþátta með litla sameindaþyngd (þyngdarhlutfall) í heildarsýninu,

— upplýsingar um óhreinindi, aukefni og aðra efnisþætti, sem eru ekki fjölliður, gefið sem þyngdarhlutfall í heildarsýninu.

2.2.5. **Mat:**

— mat sem byggist á tíma: allar aðferðir sem eru notaðar til að tryggja tilskilda samanburðarnákvæmni (leiðréttingaraðferð, innri staðall o.s.frv.),

— upplýsingar um hvort matið er grundvallað á skolrúmmálinu eða rástímanum,

— upplýsingar um viðmiðunarmörk matsins ef toppurinn hefur ekki verið greindur til fullnustu,

— lýsing á jöfnunaraðferðum, ef þær eru notaðar,

— aðferðir við að undirbúa og formeðhöndla sýnið,

— tilvist óuppleystra agna, ef um þær er að ræða,

— inngjafarrúmmál (µl) og inngjafarstyrkur (mg/ml),

— athuganir sem benda til áhrifa sem orsaka frávik frá ákjósanlegasta sniðriti úr gegndræpisskiljun,

— ítarleg lýsing á öllum breytingum í prófunarferlunum,

— upplýsingar um skekkjusvið,

— allar aðrar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3. **HEIMILDIR**

1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979) Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

3) ASTM D 3536-91, (1991) Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

4) ASTM D 5296-92, (1992) Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Viðbætir

Leiðbeiningar um hvernig innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd skal leiðrétt fyrir óleysanlegar fjölliður

Ef óleysanleg fjölliða er í sýninu veldur það því að massatap verður í gegndræpisskiljuninni. Óleysanlegu fjölliðunni er haldið eftir til frambúðar á súlunni eða í sýnasíunni en leysanlegi hluti sýnisins fer gegnum súluna. Ef unnt er að meta eða mæla hækkun á brotstuðli (dn/dc) fjölliðunnar er hægt að meta massatap sýnisins á súlunni. Þá er leiðrétt með því að beita ytri kvörðun með staðalefnum af þekktum styrk og dn/dc til að kvarða útslag ljósbrotsmælisins. Í eftirfarandi dæmi er notaður pólý(metýlmetakrýlat)-staðall (pMMA).

Við ytri kvörðunina, sem er gerð til að greina akrýlfjölliður, er pMMA-staðall með þekktum styrk í tetrahýdrófúrani greindur með gegndræpisskiljun og niðurstöðurnar eru notaðar til að finna fasta ljósbrotsmælisins samkvæmt jöfnunni:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

þar sem:

K = fasti ljósbrotsmælisins (í míkróvoltsekúndum/ml),
R = útslag pMMA-staðalsins (í míkróvoltsekúndum),
C = styrkur pMMA-staðalsins (í mg/ml),
V = inngjafarrúmmálið (í ml) og dn/dc = hækkun brotstuðulsins fyrir pMMA í tetrahýdrófúrani (í ml/mg).

Eftirfarandi gögn eru dæmigerð fyrir pMMA-staðal:

R = 2937891
C = 1,07 mg/ml
V = 0,1 ml
dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

K-gildið sem þá fæst, $3{,}05 \times 10^{11}$, er svo notað til að reikna fræðilegt útslag nemans miðað við að 100% fjölliðunnar hafi skolast út gegnum nemann.

A.20. LEYSANLEIKI/ÚTDRAGANLEIKI FJÖLLIÐNA Í VATNI

1. AÐFERÐ

Aðferðin, sem er lýst, er sú sama og í endurskoðuðu útgáfunni af OECD-viðmiðunarreglu 120 um prófanir (1997). Frekari tæknilegar upplýsingar eru gefnar í 1. heimild.

1.1. INNGANGUR

Fyrir tilteknar fjölliður, s.s ýrufjölliður, er hugsanlegt að undirbúningsvinna þurfi að fara fram áður en unnt er að nota þá aðferð sem lýst er hér fyrir aftan. Aðferðin er hvorki nothæf fyrir fljótandi fjölliður né fyrir fjölliður sem hvarfast við vatn við prófunarskilyrðin.

Ef aðferðin hentar ekki eða ekki er gerlegt að beita henni er unnt að rannsaka leysanleikann/útdraganleikann með öðrum aðferðum. Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem er notuð og rökstyðja notkun hennar.

1.2. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Leysanleiki/útdraganleiki fjölliðnanna í vatni er ákvarðaður með flöskuaðferðinni (sjá A.6 vatnsleysanleiki, flöskuaðferð) með þeim breytingum sem er lýst hér fyrir aftan.

1.4. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Búnaður**

Aðferðin útheimtir eftirfarandi búnað:

— mölunartæki, t.d. kvörn sem skilar ögnum með þekktri stærð,

— hristibúnað með möguleika til hitastýringar,

— himnusíukerfi,

— greiningartæki við hæfi,

— stöðluð sigti.

1.5.2. **Undirbúningur sýnis**

Fyrst þarf að mala dæmigert sýni þannig að agnastærðin verði 0,125–0,25 mm, ákvörðuð með viðeigandi sigtum. Hugsanlega þarf að beita kælingu til að tryggja stöðugleika sýnisins við mölunina. Efni með gúmkennda eiginleika má mala við hitastig fljótandi köfnunarefnis (1. heimild).

Ef æskileg agnastærð næst ekki skal mala efnið eins smátt og framast er unnt og skrá niðurstöðurnar. Í skýrslunni er nauðsynlegt að tilgreina hvernig malaða sýnið var geymt fyrir prófunina.

1.5.3. **Verkferli**

Þrjú sýni prófunarefnisins, hvert 10 g, eru sett hvert í sitt ílát með glertappa og 1000 ml af vatni er bætt við í hvert ílát. Ef ógerlegt reynist að meðhöndla 10 g af fjölliðunni skal nota mesta magnið sem unnt er að meðhöndla og stilla rúmmál vatnsins í hlutfalli við það.

Ílátunum er þéttlokað og þau síðan hrist við 20 °C. Nota skal hristi- eða hræribúnað sem getur unnið við stöðugt hitastig. Að liðnum 24 klukkustundum skal sía innihald hvers íláts eða setja það í skilvindu og ákvarða styrk fjölliðunnar í tæra vatnsfasanum með viðeigandi greiningaraðferð. Ef heppilegar greiningaraðferðir fyrir vatnsfasann standa ekki til boða er unnt að meta heildarleysanleikann eða heildarútdraganleikann út frá þurrvigt þess efnis, sem situr eftir í síunni, eða botnfallinu sem fellur til við skiljunina.

Að jafnaði er nauðsynlegt að greina megindlega milli óhreinindanna og aukefnanna annars vegar og efnisþátta með litla sameindaþyngd hins vegar. Ef þyngdarmælingu er beitt er enn fremur mikilvægt að gera blanksýnisprófun þar sem ekkert prófunarefni er notað svo að taka megi tillit til efnaleifa úr sjálfu tilraunaferlinu.

Ákvarða má leysanleika/útdraganleika fjölliðna í vatni við 37 °C og pH-gildið 2 og pH-gildið 9 á sama hátt og lýst er fyrir framkvæmd tilraunarinnar við 20 °C. Ná má þessum pH-gildum með því að bæta í lausnina annaðhvort heppilegum jöfnum eða viðeigandi sýrum eða bösum, t.d. saltsýru, ediksýru, greiningarhreinu natríum- eða kalíumhýdroxíði eða NH_3.

Framkvæma skal eina eða tvær prófanir eftir því hvaða efnagreiningaraðferð er notuð. Ef nægilega sértækar aðferðir standa til boða fyrir beina greiningu vatnsfasans, að því er varðar fjölliðuþáttinn, ætti ein prófun, samkvæmt lýsingu hér að framan, að nægja. Standi slíkar aðferðir hins vegar ekki til boða og einskorðist ákvörðun á leysanleika/útdraganleika fjölliðunnar við óbeina greiningu, sem felst í að ákvarða eingöngu heildarmagn lífræns kolefnis í vatnsfasanum, skal framkvæma aðra prófun. Þessi viðbótarprófun skal framkvæmd með þremur sýnum þar sem notaður er tíundi hluti af magni fjölliðunnar en sama magn vatns og í fyrstu prófuninni.

1.5.4. **Greining**

1.5.4.1. *Prófun með aðeins einni stærð sýnis*

Hugsanlega eru til aðferðir til að greina fjölliðuþættina í vatnsfasanum beint. Ef svo er ekki skal kanna hvort koma megi við óbeinni greiningu á uppleystu eða útdregnu fjölliðuþáttunum með því að ákvarða heildarinnihald leysanlegu efnisþáttanna og leiðrétta fyrir efnisþáttum sem eru ekki fjölliður.

Greining á vatnsfasanum með tilliti til heildarinnihalds fjölliðuefnisþátta er gerleg:

annaðhvort með nægilega næmri aðferð, t.d.:

— ákvörðun á heildarmagni lífræns kolefnis með sundrun í koltvísýring með persúlfati eða díkrómati og því næst mælingu með innroðagreiningu eða efnagreiningu,

— frumeindagleypnimælingu (AAS) eða jafngildi hennar, rafgasljómun (IPC), fyrir fjölliður sem í er kísill eða málmur,

— útblámagleypnimælingu (e. *UV absorption*) eða flúrskinslitrófsmælingu (e. *spectrofluorimetry*) fyrir arýlfjölliður eða

— vökvaskiljun-massagreiningu (LC-MS) fyrir sýni með litla sameindaþyngd,

eða með því að láta vatnskennda útdráttarvökvann gufa upp í lofttæmi og beita síðan litrófsgreiningu (IR, ÚF o.s.frv.) eða frumeindagleypnimælingu/rafgasgreiningu (AAS/IPC) á leifarnar.

Ef greining á vatnsfasanum sjálfum er ekki framkvæmanleg skal beita útdrætti á vatnsfasann með lífrænum leysi sem blandast ekki vatni, t.d. klóruðu vetniskolefni. Leysirinn er síðan látinn gufa upp og leifin greind, eins og að framan greinir, með tilliti til innihalds fjölliðna. Allir efnisþættir í leifunum, sem greinast sem óhreinindi eða aukefni, skulu koma til frádráttar við ákvörðun á leysanleika/útdraganleika fjölliðunnar sjálfrar.

Ef tiltölulega mikið er af slíkum efnum getur verið nauðsynlegt að greina leifarnar með t.d. hágæða-vökvaskiljun eða gasskiljun til að greina óhreinindin frá einliðunni og efnaafleiðum hennar þannig að ákvarða megi raunverulegt innihald þess síðarnefnda.

Í sumum tilvikum getur verið nægilegt að láta lífræna leysinn gufa upp og vega þurru leifina.

1.5.4.2. *Prófun með tveimur mismunandi stærðum sýnis*

Allur vatnskenndur útdráttur er greindur með tilliti til heildarmagns lífræns kolefnis.

Þyngdarmælingu er beitt á þann hluta sýnisins sem leysist ekki upp eða dregst ekki út. Ef leifar fjölliðu sitja eftir innan á vegg einhvers ílátanna þegar þau hafa verið sett í skilvindu eða innihaldið síað skal hreinsa ílátið með síuvökvanum þar til allar sýnilegar leifar eru horfnar. Síðan skal síuvökvinn síaður eða settur í skilvindu á ný. Leifarnar, sem sitja eftir í síunni eða í skilvinduglasinu, skulu þurrkaðar við 40 ºC í lofttæmi og vegnar. Þurrkun skal haldið áfram þar til þyngdin er orðin stöðug.

2. **GÖGN**

2.1. PRÓFUN MEÐ AÐEINS EINNI STÆRÐ SÝNIS

Tilgreina skal niðurstöður fyrir öll ílátin þrjú, svo og meðalgildi, og gefa þær upp í einingunum massi á rúmmál lausnar (að jafnaði mg/l) eða massi á massa fjölliðusýnis (að jafnaði mg/g). Auk þess skal tilgreina þyngdartap sýnisins (reiknað sem þyngd uppleysts efnis, deilt með þyngd upphaflega sýnisins). Reikna skal hlutfallslegt staðalfrávik. Gefa skal einstök gildi fyrir allt efnið (fjölliðu + mikilvæg aukefni o.s.frv.) og fyrir fjölliðuna eina (þ.e. þegar hlutdeild aukefna af þessu tagi hefur verið dregin frá).

2.2. PRÓFUN MEÐ TVEIMUR MISMUNANDI STÆRÐUM SÝNIS

Einstök gildi fyrir heildarmagn lífræns kolefnis í vatnsútdrættinum í báðum þreföldu tilraununum og meðalgildi fyrir hverja tilraun skulu gefin sem massaeiningar á rúmmál lausnar (að jafnaði mg C/l), svo og í einingunni massi á massa upphaflega sýnisins (að jafnaði mg C/g).

Ef enginn munur er á niðurstöðum fyrir hátt eða lágt hlutfall milli sýnis og vatns getur það bent til þess að allir útdraganlegir efnisþættir hafi í reynd dregist út. Ef sú er raunin er bein greining að öllu jöfnu óþörf.

Þyngdir leifanna skal hverju sinni gefa upp sem hundraðshluta af upphaflegum þyngdum sýnanna. Meðaltöl skulu reiknuð í hverri tilraun. Mismunurinn milli 100 og hundraðshlutans, sem fundinn var, jafngildir hundraðshluta leysanlegra og útdraganlegra efna í upphaflega sýninu.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

3.1.1. **Prófunarefni:**

— fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið (auðkenni, aukefni og óhreinindi og innihald efnisþátta með litla sameindaþyngd).

3.1.2. **Tilraunaskilyrði:**

— lýsing á verkferlunum, sem fylgt var, og tilraunaskilyrðum,

— lýsing á greiningar- og mæliaðferðum.

3.1.3. **Niðurstöður:**

— niðurstöður um leysni/útdraganleika í mg/l, stök gildi og meðalgildi fyrir útdráttarprófanir fyrir mismunandi lausnir, skipt niður í innihald fjölliðu og óhreinindi, aukefni o.s.frv.,

— niðurstöður um leysanleika/útdraganleika í mg/g fjölliðu,

— gildi fyrir heildarmagn lífræns kolefnis í vatnsútdrættinum, þyngd uppleysta efnisins og reiknaðir hundraðshlutar, ef mælt,

— sýrustig hvers sýnis,

— upplýsingar um gildi í blanksýnisprófunum,

— tilvísanir í upplýsingar um efnafræðilegan óstöðugleika prófunarefnisins, bæði í prófunarferlinu og greiningarferlinu, ef nauðsyn krefur,

— allar upplýsingar sem eru mikilvægar við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

A.21. **OXUNAREIGINLEIKAR (VÖKVAR)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Þessi aðferð er ætluð til mælingar á getu fljótandi efnis til að auka brunahraða eða brunastyrk brennanlegs efnis eða getu þess til að mynda blöndu með brennanlegu efni sem kviknar sjálfkrafa í þegar þessum tveimur efnum hefur verið blandað vandlega saman. Aðferðin byggist einkum á prófunaraðferð SÞ fyrir oxandi vökva (1. heimild) og er jafngild henni. Þar eð þessi aðferð, A.21, er fyrst og fremst hönnuð til að fullnægja kröfum samkvæmt tilskipun (EB) nr. 1907/2006 er þó aðeins krafist samanburðar við eitt viðmiðunarefni. Það kann að vera nauðsynlegt að gera prófanir og samanburð með fleiri viðmiðunarefnum ef þess er að vænta að niðurstöðurnar verði notaðar í öðrum tilgangi. ([1])

Ekki þarf að gera þessa prófun ef athugun á byggingarformúlu efnisins sýnir ótvírætt að það getur ekki hvarfast á útverminn hátt við brennanlegt efni.

Gagnlegt er að afla upplýsinga um hugsanlega sprengifimi efnisins áður en þessi prófun er gerð.

Þessi prófun hentar ekki fyrir föst efni, lofttegundir, sprengifim efni, mjög eldfim efni eða lífræn peroxíð.

Prófunin kann að vera óþörf ef þegar liggja fyrir niðurstöður fyrir prófunarefnið úr SÞ-prófuninni fyrir oxandi vökva (1. heimild).

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Meðaltími þrýstingshækkunar er meðaltal mælinga á þeim tíma sem það tekur prófunarblönduna að valda þrýstingshækkun úr 690 kPa í 2070 kPa yfir þrýstingi andrúmslofts.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Nauðsynlegt viðmiðunarefni er 65% (þyngdarhlutfall) saltpéturssýra (af greiningarhreinleika) í vatnslausn. ([2])

Sjái rannsakandi fram á að niðurstöðurnar úr þessari prófun kunni að verða notaðar síðar í öðrum tilgangi ([1]) getur verið æskilegt að prófa einnig önnur viðmiðunarefni. ([3])

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarvökvanum er blandað saman við trefjótt beðmi í massahlutfallinu 1:1 og settur í þrýstihylki. Verði sjálfsíkviknun við blöndun eða áfyllingu er frekari prófun ónauðsynleg.

Verði ekki sjálfsíkviknun er prófunin framkvæmd til fulls. Blandan er hituð í þrýstihylki og meðaltíminn, sem það tekur þrýstinginn að hækka úr 690 kPa í 2070 kPa yfir þrýstingi andrúmslofts, er ákvarðaður. Niðurstöðurnar eru bornar saman við meðaltíma þrýstingshækkunar fyrir blöndu af viðmiðunarefninu eða -efnunum og beðmi í hlutfallinu 1:1.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Niðurstöður úr fimm tilraunum í röð á einu efni mega ekki víkja meira en 30% frá reiknuðu meðaltali. Niðurstöður, sem víkja meira en 30% frá meðaltalinu, skulu ekki notaðar heldur skal bæta blöndunar- og áfyllingarferlið og endurtaka tilraunina.

([1]) Eins og t.d. innan ramma flutningareglugerða SÞ.

([2]) Títra skal sýruna fyrir prófun til að staðfesta styrk hennar.

([3]) T.d. er í 1. heimild notuð 50% (þyngdarhlutfall) perklórsýra og 40% (þyngdarhlutfall) natríumklórat.

1.6. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

1.6.1.1. Brennanlegt efni

Þurrkað, trefjótt beðmi með trefjalengd milli 50–250 µm og meðalþvermál 25 µm ([1]) er notað sem brennanlegt efni. Það er þurrkað, þar til það hefur náð stöðugri þyngd í lagi sem er ekki yfir 25 mm að þykkt, við 105 °C í fjórar klukkustundir og geymt í þurrkara með rakadrægu efni þar til það hefur kólnað og skal notað. Vatnsmagnið í þurrkaða beðminu á að vera minna en 0,5% miðað við þurrmassa ([2]). Ef þörf krefur skal framlengja þurrkunartímann til að þetta náist. ([3]) Nota skal sömu framleiðslulotu beðmis í allri prófuninni.

1.6.1.2. *Búnaður*

1.6.1.2.1. Þrýstihylki

Við prófunina skal nota þrýstihylki. Hylkið er sívalt þrýstihylki úr stáli, 89 mm að lengd og 60 mm að ytra þvermáli (sjá mynd 1). Tvær gagnstæðar hliðar á þrýstihylkinu eru sorfnar flatar (þannig að þversnið þrýstihylkisins minnkar í 50 mm) til að auðveldara verði að halda hylkinu föstu á meðan kveikjutappanum og loftunartappanum er komið fyrir. Í báðum endum þrýstihylkisins, sem er með 20 mm borvídd, hefur borvíddin verið aukin fyrstu 19 mm og snittað fyrir 1" rör samkvæmt breskum staðli (BSP) eða sömu stærð samkvæmt metrakerfinu. Þrýstiventill í formi hliðargreinar er skrúfaður í ávalt yfirborð þrýstihylkisins í 35 mm fjarlægð frá öðrum endanum og myndar 90° horn við sorfnu fletina. Borað er 12 mm djúpt gat fyrir þrýstiventilinn og það snittað fyrir 1/2" skrúfgang samkvæmt breskum staðli á enda hliðargreinarinnar (eða sömu stærð samkvæmt metrakerfinu). Ef þörf krefur er þétti úr hvarftregu efni komið fyrir til að tryggja að ekki komi til gasleka. Hliðargreinin nær 55 mm út fyrir bol þrýstihylkisins og er með borvíddina 6 mm. Í enda hliðargreinarinnar er borvíddin aukin og snittað fyrir þrýstiskynjara með himnu. Nota má hvers konar þrýstingsmælibúnað svo fremi að heitar lofttegundir eða niðurbrotsefni hafi ekki áhrif á hann og hann geti brugðist við þrýstingshækkun á bilinu 690–2070 kPa á 5 ms eða styttri tíma.

Þeim enda þrýstihylkisins, sem er fjær hliðargreininni, er lokað með kveikjutappa sem er með tveimur rafskautum og er annað skautið einangrað frá meginhluta tappans en hitt jarðtengt við hann. Hinum enda þrýstihylkisins er lokað með sprengidiski (sem brestur við u.þ.b. 2200 kPa þrýsting) sem tappi með 20 mm gati heldur föstum. Ef þörf krefur er notað þétti úr hvarftregu efni með kveikjutappanum til að tryggja að ekki komi til gasleka. Standur (mynd 2) heldur samstæðunni í réttri stöðu á meðan hún er í notkun. Standurinn er venjulega plata úr mjúku stáli, 235 mm × 184 mm × 6 mm, og 185 mm langur ferstrendur hólkur sem er 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Skorinn er bútur úr tveimur gagnstæðum hliðum á öðrum enda hólksins svo að úr verður form á tveimur fótum með flötum hliðum í beinu framhaldi af 86 mm löngum óskornum kassa. Endarnir á þessum flötu hliðum eru skornir þannig að þeir myndi 60° horn við láréttan flöt og þeir eru síðan soðnir við plötuna. Rauf, sem er 22 mm breið og 46 mm djúp, er sorfin í efri hluta kassans á annarri fótarhliðinni svo að hliðargreinin falli í raufina þegar þrýstihylkissamstæðunni er komið fyrir í kassahluta standsins þannig að kveikjutappinn snúi niður. Stálbútur, sem er 30 mm breiður og 6 mm á þykkt, er soðinn við neðra, innra borð kassans og gegnir hlutverki millistykkis. Tvær 7 mm þumalskrúfur eru skrúfaðar í hinum megin frá til að halda þrýstihylkinu kirfilega föstu. Tvær 12 mm breiðar ræmur úr 6 mm þykku stáli, sem eru soðnar á flötu fæturna við neðri enda kassans, bera þrýstihylkið uppi.

1.6.1.2.2. Kveikjukerfi

Kveikjukerfið er 25 cm langur vír úr Ni/Cr sem er 0,6 mm í þvermál og með viðnámið 3,85 ohm/m. Vírinn er undinn í gorm utan um tein, sem er 5 mm að þvermáli, og festur við rafskaut kveikjutappans. Útfærsla gormsins skal vera önnur þeirra sem sýndar eru á mynd 3. Fjarlægðin frá botni hylkisins að neðri brún kveikigormsins skal vera 20 mm. Ef rafskautin eru ekki stillanleg skal einangra endana á kveikjuvírnum milli gormsins og botns þrýstihylkisins með keramíkslíðri. Vírinn er hitaður með aflgjafa sem getur gefið stöðugan straum sem er a.m.k. 10 A.

1.6.2. **Framkvæmd prófunarinnar** ([4])

Tækjabúnaðinum, fullsamsettum með þrýstiskynjara og hitunarkerfi á sínum stað en án sprengidisks, er komið fyrir á standinum þannig að endinn með kveikjutappanum snúi niður. Í bikarglasi úr gleri er 2,5 g af prófunarvökvanum og 2,5 g af þurrkuðu beðmi blandað saman með hræripinna úr gleri ([5]) Til öryggis er rétt að hafa öryggishlíf milli þess sem blandar og blöndunnar á meðan blöndun fer fram. Ef kviknar í

([1]) T.d. Whatmans-beðmiduft fyrir súluskiljun CF 11, verðlistanr. 4021 050.

([2]) Staðfest t.d. með Karls-Fishers-títrun.

([3]) Þessu vatnsinnihaldi er t.d. einnig hægt að ná með hitun við 105 °C í lofttæmi í 24 klst

([4]) Farið skal með blöndur oxara og beðmis eins og þær geti verið sprengifimar og meðhöndla þær með tilhlýðilegri varúð.

([5]) Í raun er hægt að gera þetta með því að útbúa blöndu prófunarvökva og beðmis í hlutföllunum 1:1 í meira magni en þarf fyrir tilraunina og færa 5 ± 0,1 g yfir í þrýstihylkið. Blandan verður að vera nýlöguð fyrir hverja tilraun.

blöndunni við blöndun eða áfyllingu er ekki þörf á frekari prófunum. Blöndunni er hellt í smáum skömmtum með því að banka létt í þrýstihylkið og þess gætt að hún umljúki kveikigorminn og sé í góðri snertingu við hann. Mikilvægt er að gormurinn aflagist ekki við bankið því að það gæti leitt til þess að niðurstöðurnar yrðu rangar ([1]) Sprengidiskinum er komið fyrir og gataði tappinn skrúfaður fast á. Áfyllta hylkinu er komið fyrir þannig að sprengidiskurinn snúi upp á kveikjustandinum sem á að vera í hentugum, brynvörðum dragskáp eða kveikihólfi. Aflgjafinn er tengdur við ytri skaut kveikjutappans og 10 A straumi er hleypt á. Ekki má líða lengri tími en 10 mínútur frá því að blöndun hefst og þar til straumi er hleypt á.

Merkið, sem þrýstiskynjarinn gefur, er skráð í viðeigandi kerfi sem gerir kleift bæði að meta sambandið milli tíma og þrýstings og skrá það varanlega (t.d. má nota gagnaskráningarkerfi sem er tengt við sírita (e. *chart recorder*)). Blandan er hituð upp þar til sprengidiskurinn brestur eða þar til liðnar eru a.m.k. 60 sek. Bresti sprengidiskurinn ekki skal blandan látin kólna og síðan skal tækjabúnaðurinn tekinn varlega í sundur og skal gæta varúðar vegna hugsanlegs yfirþrýstings. Gerðar eru fimm tilraunir með prófunarefninu og viðmiðunarefninu eða -efnunum. Skráður er tíminn sem það tekur þrýstinginn að hækka úr 690 kPa í 2070 kPa yfir loftþrýstingi. Reiknaður er meðaltími þrýstingshækkunar.

Í sumum tilvikum geta efnin framkallað (of mikla eða of litla) þrýstingshækkun sem stafar af efnahvörfum og tengist ekki oxunareiginleikum efnisins. Þegar svo er kann að reynast nauðsynlegt að endurtaka prófunina með hvarftregu efni, t.d. díatómíti (kísilgúr) í stað beðmisins, til að fá skýrari mynd af eðli hvarfanna.

2. GÖGN

Þrýstingshækkunartímar fyrir bæði prófunarefnið og viðmiðunarefnið eða -efnin. Þrýstingshækkunartímar fyrir prófanirnar með hvarftregu efni ef þær fara fram.

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Reiknaðir eru meðaltímar þrýstingshækkunar fyrir bæði prófunarefnið og viðmiðunarefnið eða –efnin.

Reiknaður er meðaltími þrýstingshækkunar fyrir prófanirnar með hvarftregu efni (ef þær fara fram).

Í töflu 1 eru sýnd nokkur dæmi um niðurstöður.

Tafla 1

Dæmi um niðurstöður ([a])

Efni ([b])	Meðaltími þrýstingshækkunar fyrir 1:1 blöndu með beðmi (ms)
Ammóníumdíkrómat, mettuð vatnslausn	20 800.
Kalsíumnítrat, mettuð vatnslausn	6700
Járn(III)nítrat, mettuð vatnslausn	4133
Litíumperklórat, mettuð vatnslausn	1686
Magnesíumperklórat, mettuð vatnslausn	777.
Nikkelnítrat, mettuð vatnslausn	6250
Saltpéturssýra, 65%	4767 ([c])
Perklórsýra, 50%	121 ([c])
Perklórsýra, 55%	59
Kalíumnítrat (saltpétur), 30% vatnslausn	26 690
Silfurnítrat, mettuð vatnslausn	([d])
Natríumklórat, 40% vatnslausn	2555 ([c])

([1]) Einkum verður að koma í veg fyrir snertingu milli aðliggjandi snúninga gormsins.

Efni ([b])	Meðaltími þrýstingshækkunar fyrir 1:1 blöndu með beðmi (ms)
Natríumnítrat, 45% vatnslausn	4133
Hvarftregt efni	
Vatn: beðmi	([d])

([a]) Sjá 1. rit í heimildarskrá um flokkun skv. flutningakerfi SÞ.
([b]) Mettaðar lausnir skulu búnar til við 20 °C.
([c]) Meðalgildi úr fjölsetra samanburðarrannsóknum.
([d]) Hámarksþrýstingnum 2070 kPa ekki náð.

3. **SKÝRSLA**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

— auðkenni prófunarefnisins, samsetning, hreinleiki o.s.frv.,

— styrkur prófunarefnisins,

— verkferlið sem fylgt er við þurrkun beðmisins,

— vatnsinnihald beðmisins sem er notað,

— niðurstöður mælinga,

— niðurstöður úr prófunum með hvarftregu efni, ef slíkar prófanir fóru fram,

— reiknaður meðaltími þrýstingshækkunar,

— frávik frá þessari aðferð og ástæður þeirra,

— allar aðrar upplýsingar eða athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA ([1])

Prófunarniðurstöður eru metnar með hliðsjón af:

a) hvort sjálfsíkviknun verður í blöndu prófunarefnisins og beðmis og

b) meðaltímanum sem það tekur þrýstinginn að hækka úr 690 kPa í 2070 kPa, samanborið við viðmiðunarefni(n).

Fljótandi efni telst vera oxari ef:

a) sjálfsíkviknun verður í blöndu efnisins og beðmis í massahlutfallinu 1:1 eða

([1]) Sjá 1. rit í heimildaskrá fyrir túlkun niðurstaðna, innan ramma flutningareglugerða SÞ, úr prófunum með mörgum viðmiðunarefnum.

b) blanda efnisins og beðmis í massahlutfallinu 1:1 sýnir meðalþrýstingshækkunartíma sem er minni en eða jafn meðalþrýstingshækkunartíma fyrir blöndu af 65% (þyngdarhlutfall) saltpéturssýru í vatnslausn og beðmi í massahlutfallinu 1:1.

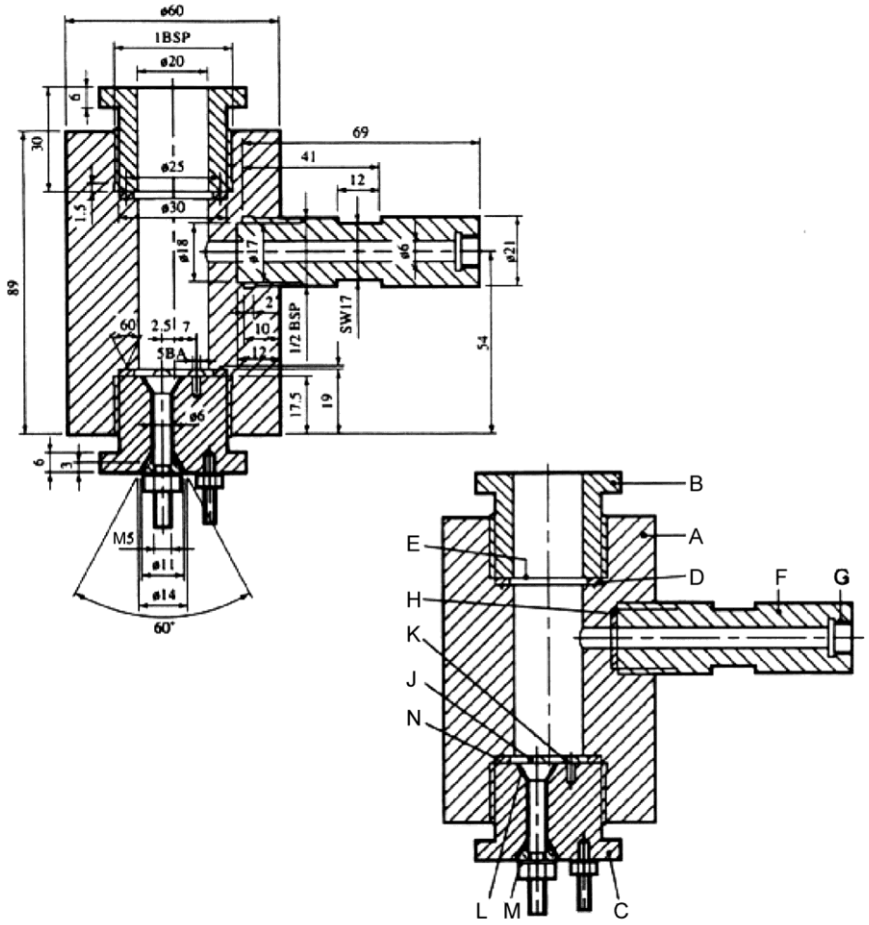
Til að komast hjá falsjákvæðum niðurstöðum skal við túlkun niðurstaðna einnig skoða, ef þörf krefur, niðurstöðurnar sem fengust við prófun efnisins með hvarftregu efni.

4. **HEIMILDIR**

1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, bls. 342. Test O.2: Test for oxidising liquids.

Mynd 1

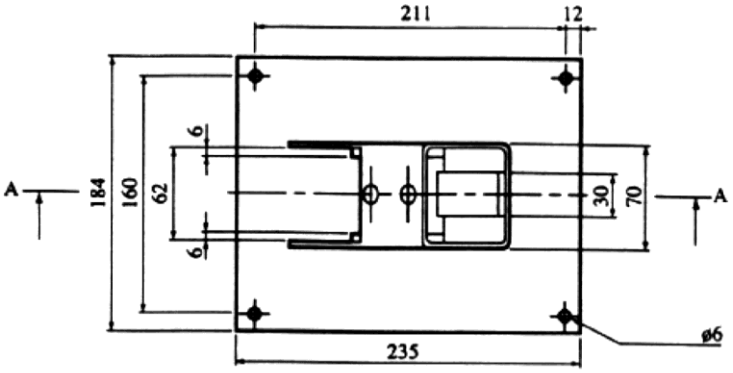
Þrýstihylki

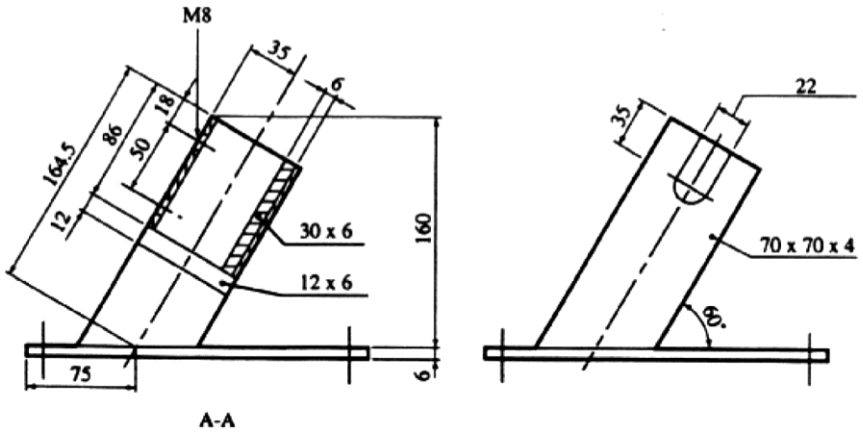


A) Bolur þrýstihylkisins
B) Gataður tappi sprengidisksins
C) Kveikjutappi
D) Skífa úr mjúku blýi
E) Sprengidiskur
F) Hliðargrein
G) Festing fyrir þrýstiskynjara
H) Skífa
J) Einangrað rafskaut
K) Jarðtengt rafskaut
L) Einangrun
M) Stálkeila
N) Skífugróp

Mynd 2

Standur

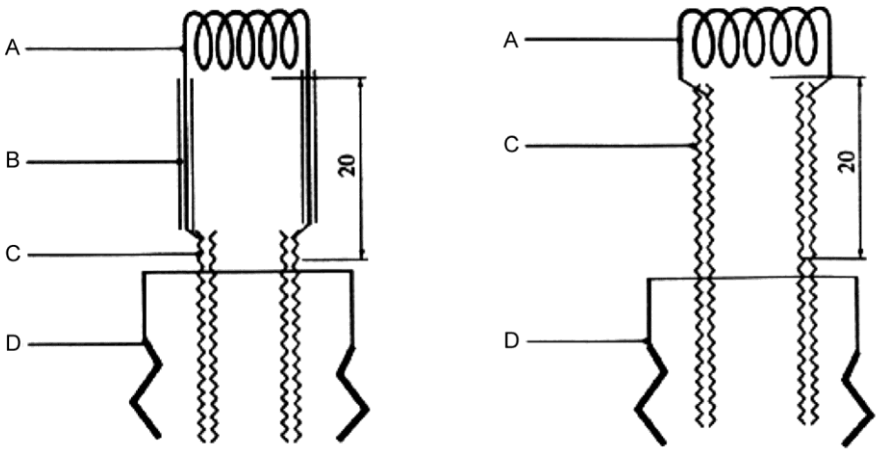




Mynd 3

Kveikjukerfi

A) Kveikigormur B) Einangrun C) Rafskaut D) Kveikjutappi



Athugasemd: Nota má hvora útfærsluna sem er.

B-HLUTI: AÐFERÐIR VIÐ AÐ ÁKVARÐA EITURHRIF OG ÖNNUR ÁHRIF Á HEILBRIGÐI

EFNISYFIRLIT

	ALMENNUR INNGANGUR	143
B.1a.	BRÁÐ EITURHRIF UM MUNN — FASTSKAMMTAAÐFERÐ	145
B.1b.	BRÁÐ EITURHRIF UM MUNN — AÐFERÐ TIL AÐ ÁKVARÐA FLOKKA BRÁÐRA EITURHRIFA	158
B.2.	BRÁÐ EITURHRIF (INNÖNDUN)	174
B.3.	BRÁÐ EITURHRIF (UM HÚÐ)	178
B.4.	BRÁÐ EITURHRIF: HÚÐERTING/HÚÐÆTING	182
B.5.	BRÁÐ EITURHRIF: AUGNERTING/AUGNÆTING	191
B.6.	HÚÐNÆMING	202
B.7.	EITURHRIF (UM MUNN) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)	210
B.8.	EITURHRIF (INNÖNDUN) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)	216
B.9.	EITURHRIF (UM HÚÐ) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)	221
B.10.	STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í GLASI Á LITNINGABREYTINGUM Í SPENDÝRUM	225
B.11.	STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í LÍFI Á LITNINGABREYTINGUM Í BEINMERG SPENDÝRA	233
B.12.	STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í LÍFI Á SMÁKJÖRNUM RAUÐKORNA HJÁ SPENDÝRUM	240
B.13/14.	STÖKKBREYTANDI HRIF: PRÓFUN Á BAKSTÖKKBREYTINGUM HJÁ BAKTERÍUM	248
B.15.	PRÓFUN Á STÖKKBREYTANDI HRIFUM OG SKIMUN FYRIR KRABBAMEINSVALDANDI GENASTÖKK-BREYTINGUM — SACCHAROMYCES CEREVISIAE	256
B.16.	ENDURRÖÐUN Í MÍTÓSU — SACCHAROMYCES CEREVISIAE	259
B.17.	STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í GLASI Á GENASTÖKKBREYTINGUM Í SPENDÝRAFRUMUM	262
B.18.	DNA-SKEMMD OG DNA-VIÐGERÐ — ÓFYRIRSÉÐ DNA-NÝMYNDUN — SPENDÝRAFRUMUR Í GLASI	271
B.19.	PRÓFUN Í GLASI Á VÍXLUN SYSTURLITNINGSÞRÁÐA	275
B.20.	PRÓFUN Á KYNBUNDNUM, VÍKJANDI BANAGENUM HJÁ DROSOPHILA MELANOGASTER	279
B.21.	PRÓFANIR Í GLASI Á UMMYNDUN SPENDÝRAFRUMNA	282
B.22.	PRÓFUN Á RÍKJANDI BANAGENUM HJÁ NAGDÝRUM	285
B.23.	PRÓFUN Á LITNINGABREYTINGUM Í SÁÐSTOFNFRUMUM SPENDÝRA	288
B.24.	BLETTAPRÓFUN Á MÚSUM	295

B.25. ARFGENG LITNINGAYFIRFÆRSLA Í MÚSUM 298

B.26. PRÓFUN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM MUNN — 90 DAGA RANNSÓKN Á EITURHRIFUM HJÁ NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA UM MUNN 302

B.27. PRÓFUN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM MUNN — 90 DAGA RANNSÓKN Á EITURHRIFUM HJÁ ÖÐRUM DÝRUM EN NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA UM MUNN 308

B.28. RANNSÓKN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM HÚÐ — 90 DAGA RANNSÓKN Á NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA Á HÚÐ 314

B.29. RANNSÓKN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM VIÐ INNÖNDUN — 90 DAGA RANNSÓKN Á NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA VIÐ INNÖNDUN 318

B.30. PRÓFUN Á LANGVINNUM EITURHRIFUM 323

B.31. RANNSÓKN Á EITURHRIFUM Á ÞROSKUN Á FORBURÐARSKEIÐI 329

B.32. PRÓFUN Á KRABBAMEINSVALDANDI EIGINLEIKUM 338

B.33. SAMEINUÐ RANNSÓKN Á LANGVINNUM EITURHRIFUM OG KRABBAMEINSVALDANDI EIGINLEIKUM 344

B.34. PRÓFUN Á EITURHRIFUM Á ÆXLUN HJÁ EINNI KYNSLÓÐ 351

B.35. RANNSÓKN Á EITURHRIFUM Á ÆXLUN HJÁ TVEIMUR KYNSLÓÐUM 355

B.36. EITURHVARFAFRÆÐI 365

B.37. SÍÐKOMIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM FOSFÓRLÍFRÆNNA EFNA EFTIR BRÁÐ VÁHRIF 369

B.38. SÍÐKOMIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM FOSFÓRLÍFRÆNNA EFNA Í 28 DAGA RANNSÓKN MEÐ ENDURTEKNUM SKÖMMTUM 374

B.39. PRÓFUN Í LÍFI Á ÓFYRIRSÉÐRI DNA-NÝMYNDUN Í LIFRARFRUMUM SPENDÝRA 378

B.40. RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: MÆLING Á RAFVIÐNÁMI GEGNUM HÚÐ (e. TER) 384

B.40a. RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUN MEÐ LÍKANI AF MANNSHÚÐ 394

B.41. 3T3-NRU-LJÓSEITURHRIFAPRÓFUN Í GLASI 400

B.42. HÚÐNÆMING: EITLAGREINING 414

B.43. RANNSÓKN Á TAUGAEITURHRIFUM HJÁ NAGDÝRUM 420

B.44. UPPTAKA UM HÚÐ: AÐFERÐ MEÐ PRÓFUN Í LÍFI 432

B.45. UPPTAKA UM HÚÐ: AÐFERÐ MEÐ PRÓFUN Í GLASI 438

ALMENNUR INNGANGUR

A. **LÝSING Á EIGINLEIKUM PRÓFUNAREFNISINS**

Samsetning prófunarefnisins, þ.á.m. helstu óhreinindi, og eðlisefnafræðilegir eiginleikar þess, að stöðugleika meðtöldum, skal vera þekkt áður en hafin er rannsókn á eiturhrifum.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnis veita mikilvægar upplýsingar sem nýtast við val á íkomuleið, hönnun hverrar rannsóknar um sig og meðhöndlun og geymslu prófunarefnisins.

Áður en rannsókn hefst skal þróa greiningaraðferð fyrir eigindlega og megindlega ákvörðun á prófunarefninu (þ.m.t. helstu óhreinindum ef unnt er) í skömmtunarmiðlinum og í líffræðilega efninu.

Allar upplýsingar um auðkenni, eðlisefnafræðilega eiginleika, hreinleika og hegðun prófunarefnisins skulu koma fram í prófunarskýrslunni.

B. **UMHIRÐA DÝRA**

Við rannsóknir á eiturhrifum er nauðsynlegt að hafa strangt eftirlit með umhverfisaðstæðum og beita tilhlýðilegum aðferðum við umönnun dýra.

i) *Aðbúnaður*

Umhverfisaðstæður í tilraunaherbergjum eða búrum skulu hæfa dýrategundinni sem er notuð í prófuninni. Viðeigandi aðstæður fyrir rottur, mýs og naggrísi eru herbergishiti, sem nemur 22 °C ± 3 °C, og rakastig sem nemur 30–70% en fyrir kanínur skal hitinn vera 20 ± 3 °C og rakastigið 30–70%.

Sumar tilraunaaðferðir eru sérstaklega næmar fyrir hitaáhrifum og í þeim tilvikum eru upplýsingar um hæfilegar aðstæður hafðar með í lýsingu á prófunaraðferðinni. Í öllum rannsóknum á eiturhrifum eru hiti og raki athugaðir, skráðir og tilgreindir í lokaskýrslunni.

Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Skrá skal ítarlegar upplýsingar um lýsingarmynstur og setja þær í lokaskýrsluna um rannsóknina.

Dýrin má hafa hvert í sínu búri eða litla hópa af sama kyni saman í búri nema annað sé tilgreint í aðferðinni en ekki má þó hafa fleiri en fimm dýr saman í búri.

Í skýrslum um tilraunir á dýrum er mikilvægt að tilgreina hvaða tegund búra er notuð og fjölda dýra í hverju búri, bæði á meðan váhrif frá íðefninu eiga sér stað og á athugunartímanum sem á eftir fer.

ii) *Fóðrun*

Fóðrið skal uppfylla allar næringarþarfir tegundarinnar sem verið er að prófa. Þegar dýrum eru gefin prófunarefni í fóðri getur dregið úr næringargildinu vegna víxlverkunar efnisins og einhverra fóðurþátta. Taka verður slíka virkni með í reikninginn þegar niðurstöður prófana eru túlkaðar. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.

Aðskotaefni í fóðrinu, sem vitað er að hafa áhrif á eiturvirkni, mega ekki vera í svo miklum styrk að það hafi áhrif á prófunina.

C. **STAÐGÖNGUPRÓFANIR**

Evrópusambandið hefur einsett sér að hvetja til þróunar og fullgildingar á staðgönguaðferðum sem veita jafnmiklar upplýsingar og fást með núverandi prófunum á dýrum en þar sem færri dýr eru notuð, dýrin þjást minna eða alveg er sneitt hjá notkun dýra.

Eftir því sem slíkar aðferðir verða tiltækar skal íhuga að nota þær, eftir því sem unnt er, við hættulýsingar og meðfylgjandi flokkun og merkingu efna, með tilliti til hvers kyns hættu sem stafar af efnunum, og við efnaöryggismat.

D. **MAT OG TÚLKUN**

Þegar niðurstöður dýratilrauna og rannsókna í glasi eru metnar og túlkaðar verður að taka tillit til þess að takmörk eru fyrir því að hve miklu leyti hægt er að yfirfæra þær beint á menn og þess vegna er rétt að nota rökstuddar vísbendingar um skaðleg áhrif á menn, þar sem þær liggja fyrir, til að staðfesta niðurstöður prófana.

E. **TILVÍSANIR Í HEIMILDIR**

Flestar af þessum aðferðum eru þróaðar innan ramma áætlunar Efnahags- og framfarastofnunarinnar um viðmiðunarreglur fyrir prófanir og þær ber að framkvæma í samræmi við meginreglur um góðar starfsvenjur við rannsóknir til að tryggja sem víðtækasta „gagnkvæma samþykkt gagna“.

Viðbótarupplýsingar er að finna í tilvísunum, sem taldar eru upp í viðmiðunarreglum Efnahags- og framfarastofnunarinnar, og heimildum sem tengjast þeim en eru gefnar út annars staðar.

B.1a. **BRÁÐ EITURHRIF UM MUNN — FASTSKAMMTAAÐFERÐ**

1. **AÐFERÐ**

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 420 um prófanir (2001)

1.1. INNGANGUR

Í hefðbundnum aðferðum við mat á bráðum eiturhrifum er dauði tilraunadýranna notaður sem endapunktur. Árið 1984 kom Breska eiturefnafræðifélagið með tillögu um nýja aðferð sem fólst í því að gefa tilraunadýrunum röð skammta af skilgreindri stærð (1. heimild). Í þessari aðferð var dauði tilraunadýranna ekki notaður sem endapunktur heldur var fylgst með því hvort í ljós kæmu skýr merki um eiturhrif eftir gjöf tiltekins skammts úr viðkomandi skammtaröð. Í framhaldi af fullgildingarrannsóknum í lífi í Breska konungsríkinu (2. heimild) og á alþjóðavettvangi (3. heimild) var aðferðin samþykkt sem prófunaraðferð árið 1992. Síðan hafa tölfræðilegir eiginleikar fastskammtaaðferðarinnar verið metnir með reiknilíkönum í röð rannsókna (4.–6. heimild). Með þessum rannsóknum í lífi og með reiknilíkönum hefur verið sýnt fram á að aðferðin er samanburðarnákvæm, útheimtir færri tilraunadýr og veldur minni þjáningum en hefðbundnar aðferðir og gerir það kleift að flokka efnin á svipaðan hátt og með öðrum aðferðum við prófun bráðra eiturhrifa.

Í leiðbeiningarskjalinu um prófun á bráðum eiturhrifum um munn (7. heimild) er að finna leiðbeiningar um val á heppilegustu prófunaraðferðinni fyrir tiltekið markmið. Í leiðbeiningarskjalinu eru líka viðbótarupplýsingar um framkvæmd og túlkun prófunaraðferðar B.1a.

Meginregla aðferðarinnar er að nota aðeins miðlungi eitraða skammta í meginrannsókninni og varast að gefa skammta sem vænta má að séu banvænir. Þá þarf ekki að gefa skammta sem vitað er að valda verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða mjög ertandi verkana. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um sársauka eða mikla og viðvarandi þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt og fara eins með þau við túlkun prófunarniðurstaðna og dýr sem drepast í prófuninni. Fjallað er um viðmiðanir fyrir ákvörðun um að aflífa dýr, sem eru dauðvona eða sárþjáð, og gefnar leiðbeiningar um greiningu fyrirsjáanlegs eða yfirvofandi dauða í sérstöku leiðbeiningarskjali (8. heimild).

Með aðferðinni fást upplýsingar um hættueiginleika efnisins og hún gerir kleift að skipa því í flokk samkvæmt hnattsamræmda kerfinu (HSK) (e. *Globally Harmonised System* (GHS)) til flokkunar á íðefnum sem valda bráðum eiturhrifum (9. heimild)

Prófunarstofan skal skoða allar fáanlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsóknin hefst. Þetta eru upplýsingar um auðkenni og efnafræðilega byggingu efnisins, eðlisefnafræðilega eiginleika þess, niðurstöður úr eiturhrifaprófunum á efninu í glasi (lat. *in vitro*) og í lífi (lat. *in vivo*), eiturefnafræðileg gögn um efni með skylda byggingu og upplýsingar um fyrirhugaða notkun efnisins. Þessar upplýsingar eru nauðsynlegar til að fullvissa alla hlutaðeigandi aðila um að prófunin skipti máli fyrir heilbrigðisvernd manna og komi að gagni við val á heppilegum upphafsskammti.

1.2. SKILGREININGAR

Bráð eiturhrif um munn: vísar til skaðlegra áhrifa sem koma fram eftir inngjöf um munn á einum skammti efnis eða á mörgum skömmtum sem eru gefnir á innan við 24 klukkustundum.

Síðkominn dauði: merkir að tilraunadýrið drepst hvorki né virðist dauðvona innan 48 klukkustunda en drepst síðar á 14 daga athugunartímabilinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg).

Augljós eiturhrif: almennt hugtak sem lýsir greinilegum merkjum um eiturhrif, í kjölfar þess að prófunarefni er gefið (sjá t.d. 3. heimild), með þeim hætti að eftir næststærsta fastaskammtinn má annaðhvort búast við að tilraunadýrin sýni merki um mikinn sársauka og viðvarandi og mikla þjáningu, séu dauðvona (viðmiðanir eru kynntar í leiðbeiningarskjali um mannúðlega endapunkta (8. heimild)) eða að líkur séu á dauða flestra tilraunadýranna.

HSK (e. GHS): Hnattsamræmt flokkunarkerfi fyrir efni og efnablöndur. Þessir aðilar unnu í sameiningu að kerfinu: Efnahags- og framfarastofnunin (heilbrigði manna og umhverfið), sérfræðinganefnd Sameinuðu þjóðanna um flutning á hættulegum varningi (eðlisefnafræðilegir eiginleikar) og Alþjóða-vinnumálastofnunin (hættutilkynningar) og fór samræming verksins fram innan ramma millistofnana-áætlunarinnar um örugga stjórnun á íðefnum (IOMC).

Yfirvofandi dauði: þegar þess er vænst að dýr verði að dauða komið eða dautt fyrir næsta áætlaða athugunartíma. Merki um slíkt ástand hjá nagdýrum geta verið krampar, hliðarlega, liggjandi staða og skjálfti. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild).

LD_{50} (miðgildisbanaskammtur): tölfræðilega reiknaður, stakur skammtur efnis sem búast má við að valdi dauða 50% tilraunadýranna þegar hann er gefinn um munn. LD_{50}-gildið er sett fram sem þyngd prófunarefnis á þyngdareiningu tilraunadýrs (mg/kg).

Háskammtur: skammtur við efri mörk prófunarinnar (2000 eða 5000 mg/kg).

Dauðvona dýr: dýr sem er deyjandi eða á sér engar lífslíkur þótt það verði meðhöndlað. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild).

Fyrirsjáanlegur dauði: þegar fyrir hendi eru klínísk merki sem benda til þess að dýrið muni deyja á tilteknum tíma fyrir áætluð lok tilraunarinnar en dæmi um slík merki eru að dýrið getur hvorki náð til vatns eða fóðurs. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild).

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Hópi tilraunadýra af sama kyni eru gefnir fastir skammtar, sem nema 5, 50, 300 og 2000 mg/kg (í undantekningartilvikum getur 5000 mg/kg fastur viðbótarskammtur komið til greina, sjá lið 1.6.2), með þrepskiptri aðferð. Upphafsskammtastærð er valin á grundvelli undirbúningsrannsóknar sem sá skammtur sem vænta má að kalli fram einhver merki um eiturhrif án þess að valda alvarlegum eiturverkunum eða dauða. Í sérstöku leiðbeiningarskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar (8. heimild) er klínískum einkennum og aðstæðum, sem tengjast sársauka, þjáningu og yfirvofandi dauða, lýst nánar. Gefa má öðrum hópum tilraunadýra fasta skammta sem eru stærri eða minni eftir því hvort merki um eiturhrif eða dauða koma fram eður ei. Þessu verkferli er haldið áfram þar til fundinn er sá skammtur sem veldur greinilegum eiturhrifum eða dauða aðeins eins tilraunadýrs eða þar til engin sýnileg áhrif koma í ljós við stærsta skammt eða þar til minnsti skammtur veldur dauða tilraunadýra.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Val á dýrategund**

Rottur eru ákjósanlegasta nagdýrategundin þótt nota megi aðrar tegundir nagdýra. Venjulega eru kvendýr notuð (7. heimild). Ástæðan er sú að kannanir á rituðum heimildum um hefðbundnar LD_{50}-prófanir sýna að venjulega er lítill munur á næmi kynjanna en ef slíkur munur mælist á annað borð eru kvendýrin að jafnaði örlítið næmari (10. heimild). Ef upplýsingar um eiturefnafræðilega eða eiturhvarfafræðilega eiginleika efna með skylda byggingu benda hins vegar til þess að karldýrin kunni að vera næmari er rétt að nota það kyn. Séu prófanirnar gerðar á karldýrum skal færa gild rök fyrir því.

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Við upphaf skammtagjafar skal aldur dýranna vera á bilinu 8–12 vikur og þyngd þeirra ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd dýra sem hafa áður fengið skammta af efninu.

1.4.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hitastigið í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 °C). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Hafa má nokkur dýr, sem fá sömu skammtastærð, saman í búri en ekki fleiri en svo að hægt sé að fylgjast vel með hverju dýri.

1.4.3. **Dýrin undirbúin**

Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en skammtagjöf hefst til að þau venjist umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4. **Tilreiðsla skammta**

Að öllu jöfnu skal gefa mismunandi skammta af prófunarefnum með sama rúmmáli en í breytilegum styrk. Ef prófa á efni í vökvaformi eða blöndu kann þó að henta betur að nota prófunarefnið óþynnt, þ.e. í föstum styrk, við eftirfylgjandi áhættumat á því efni enda gera sum stjórnvöld kröfu um slíkt. Í hvorugu tilvikinu má gefa meira en sem nemur rúmmáli hámarksskammtsins. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í

einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Þegar um nagdýr er að ræða ætti rúmmálið að jafnaði ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar en þó geta 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina fyrir vatnslausnir. Mælt er með því að skammtarnir séu gefnir sem vatnslausn, svifblanda eða ýrulausn ef unnt er en að öðrum kosti, í eftirfarandi forgangsröð, sem lausn, svifblanda eða ýrulausn í olíu (t.d. maísolíu) og því næst geta lausnir með öðrum burðarefnum einnig komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Skammtarnir skulu útbúnir rétt fyrir gjöf nema stöðugleiki tilreidda efnisins á fyrirhuguðu notkunartímabili sé þekktur og hafi reynst viðunandi.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Gjöf skammta**

Prófunarefnið er gefið í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Ef svo ólíklega vill til að ekki sé hægt að gefa efnið inn í einum skammti má gefa skammtinn í nokkrum hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

Dýr skulu vera fastandi fyrir inngjöf (t.d. skulu rottur fá vatn en ekki fóður yfir nótt en mýs hins vegar fá vatn en ekki fóður í þrjár til fjórar klukkustundir). Eftir föstutímabilið skal vigta dýrin og gefa þeim síðan prófunarefnið. Þegar prófunarefnið hefur verið gefið má láta rottur fasta í þrjár til fjórar klukkustundir í viðbót en mýs í eina til tvær klukkustundir. Þegar skammti er skipt í marga hluta og hann gefinn inn á ákveðnu tímabili getur verið nauðsynlegt að gefa dýrunum fóður og vatn, eftir því hve langt tímabilið er.

1.5.2. **Undirbúningsrannsókn**

Markmiðið með undirbúningsrannsókninni er að velja viðeigandi upphafsskammt fyrir meginrannsóknina. Prófunarefnið er gefið dýrum, einu í einu, með raðbundinni aðferð samkvæmt flæðiritunum í 1. viðbæti. Undirbúningsrannsókninni lýkur þegar unnt er að taka ákvörðun um upphafsskammt fyrir meginrannsóknina (eða ef dýr deyr eftir minnsta fastaskammt).

Upphafsskammtur fyrir undirbúningsrannsóknina er valinn úr föstu skammtastærðunum 5, 50, 300 og 2000 mg/kg og skal vera sá skammtur sem vænta má að framkalli augljós eiturhrif samkvæmt, ef unnt er, rökstuddum vísbendingum úr rannsóknum í lífi og í glasi á sama íðefninu og einnig á íðefnum með skylda byggingu. Liggi þessar upplýsingar ekki fyrir skal upphafsskammturinn vera 300 mg/kg.

A.m.k. 24 klst. skulu líða milli þess að dýr fær skammt og þar til næsta dýr fær skammt. Fylgst skal með öllum dýrunum í a.m.k. 14 daga.

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skírskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, kemur til greina að nota fastan viðbótarskammt á efri mörkunum 5000 mg/kg (sjá 3. viðbæti). Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki séu gerðar prófanir á dýrum á skammtasviði 5. undirflokks hnattsamræmda kerfisins (2000–5000 mg/kg) enda skuli slík prófun einvörðungu yfirveguð ef miklar líkur eru á því að niðurstöður hennar hafi beina þýðingu fyrir verndun heilbrigðis manna og dýra og fyrir umhverfisvernd.

Þegar dýr drepst eftir að hafa fengið minnsta, fasta prófunarskammtinn (5 mg/kg) í undirbúningsrannsókninni er venjan að hætta rannsókninni og flokka efnið í 1. undirflokk HSK (sbr. 1. viðbæti). Sé krafist frekari staðfestingar á flokkuninni er þó heimilt að nota eftirfarandi valfrjálst viðbótarverkferli: Öðru dýri er gefinn skammturinn 5 mg/kg. Drepist þetta dýr telst flokkun í 1. undirflokk HSK staðfest og er rannsókninni þá tafarlaust hætt. Haldi dýrið lífi fá að hámarki þrjú dýr til viðbótar skammtinn 5 mg/kg. Þar eð miklar líkur eru á því að dýrin drepist skal, af ástæðum er varða velferð dýra, gefa þeim með raðbundinni aðferð. Tíminn milli þess að dýr fær skammt þar til næsta dýr fær skammt skal vera nægilega langur til að staðfesta að fyrra dýrið muni líklega halda lífi. Drepist annað dýr skal þegar í stað hætta raðbundinni gjöf skammta og ekki gefa fleiri dýrum skammt. Þar eð dauði annars dýrs (án tillits til þess hve mörg dýr hafa verið prófuð þegar prófun er hætt) leiðir til niðurstöðu A (dauði tveggja eða fleiri dýra) er fylgt flokkunarreglu 2. viðbætis við fastaskammtinn 5 mg/kg (1. undirflokkur ef tvö eða fleiri dýr drepast en 2. undirflokkur ef aðeins eitt dýr drepst). Í 4. viðbæti eru auk þess leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu þar til nýja, hnattsamræmda kerfið verður innleitt.

1.5.3. **Meginrannsókn**

1.5.3.1. *Fjöldi dýra og skammtastærðir*

Á flæðiritunum í 2. viðbæti má sjá hvernig haldið skal áfram eftir prófun með upphafsskammti. Gera þarf eitt af þrennu: hætta prófun og skipa efninu í viðeigandi hættuflokk, halda áfram prófun með stærri fastaskammti eða prófa með minni fastaskammti. Til að vernda dýrin skal þó gjöf skammts, af stærð sem olli dauða í undirbúningsrannsókninni, ekki endurtekin í meginrannsókninni (sjá 2. viðbæti). Reynslan hefur sýnt að líklegast er að prófun með upphafsskammti geri kleift að flokka efnið og því verði frekari prófun óþörf.

Að jafnaði skal nota samtals fimm dýr af sama kyni fyrir hverja skammtastærð sem er til rannsóknar. Eitt þessara fimm dýra skal vera úr undirbúningsrannsókninni og hafa fengið skammt af þeirri stærð sem valin var og síðan fjögur dýr til viðbótar (nema í undantekningartilvikum þegar notuð er skammtastærð í meginrannsókninni sem var ekki með í undirbúningsrannsókninni).

Tíminn, sem líður á milli gjafar skammta af hverri stærð, ákvarðast af því hvenær merki um eiturhrif koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg þau eru. Rétt er að bíða með að gefa dýrum næsta skammt þar til vissa er fyrir því að dýrin, sem áður fengu skammt, hafi lifað af. Mælt er með því, ef þörf krefur, að þrír til fjórir dagar líði milli þess að skammtar af hverri stærð séu gefnir til að unnt sé að greina síðkomin eiturhrif. Þessi tími má vera lengri eða styttri eftir því sem við á, t.d. ef svörun er tvíræð.

Þegar til greina kemur að nota fastan skammt á efri mörkunum 5000 mg/kg skal fylgja verkferlinu sem tilgreint er í 3.viðbæti (sjá einnig lið 1.6.2).

1.5.3.2. *Markprófun*

Markprófun er fyrst og fremst notuð þegar rannsakandinn hefur upplýsingar sem benda til þess að prófunarefnið sé óeitrað, þ.e. aðeins eitrað í skömmtum sem eru yfir lögbundnum háskömmtum. Þekking á samsvarandi, prófuðum efnasamböndum eða samsvarandi, prófuðum blöndum eða vörum getur gefið vísbendingu um eiturhrif prófunarefnisins, að teknu tilliti til tegundar og hundraðshluta innihaldsefna sem vitað er að skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti. Sé lítið sem ekkert vitað um eiturhrif prófunarefnisins eða sé þess vænst að prófunarefnið sé eitrað ber að framkvæma meginrannsóknina.

Sem markprófun fyrir þessa viðmiðunarreglu má, þegar verkferlið er samkvæmt venju, nota upphafs-skammtinn 2000 mg/kg í undirbúningsrannsókninni (eða 5000 mg/kg í undantekningartilvikum) og gefa síðan fjórum dýrum til viðbótar sama skammt.

1.6. ATHUGANIR

Hvert dýr fyrir sig er athugað a.m.k. einu sinni á fyrstu 30 mínútunum eftir skammtagjöf og með reglubundnu millibili fyrstu 24 klukkustundirnar, einkum skal gefa þeim sérstakan gaum fyrstu fjórar klukkustundirnar og daglega eftir það í alls 14 daga nema nauðsynlegt reynist að taka þau úr rannsókninni og aflífa þau á mannúðlegan hátt, af ástæðum sem varða velferð dýra, eða þau deyi í rannsókninni. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og því má lengja það gerist þess þörf. Miklu skiptir hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa, einkum þegar merki um eiturhrif koma seint í ljós (11. heimild). Skrá skal allar athuganir kerfisbundið og skal halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr.

Nauðsynlegt er að gera viðbótarathuganir ef dýrin halda áfram að sýna merki um eiturhrif. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálftum, krömpum, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Taka skal mið af meginreglunum og viðmiðunum sem eru birtar í stuttu formi í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (8. heimild) Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða viðvarandi þjáningu ætti að aflífa á mannúðlegan hátt. Þegar dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum eða komið að þeim dauðum skal skrá dauðastund eins nákvæmlega og hægt er.

1.6.1. **Líkamsþyngd**

Vigta skal hvert dýr stuttu áður en prófunarefnið er gefið og a.m.k. vikulega eftir það. Þyngdarbreytingar skulu reiknaðar og skráðar. Í lok prófunarinnar skal vigta dýrin sem eftir lifa og aflífa þau svo á mannúðlegan hátt.

1.6.2. **Meinafræði**

Framkvæma ber stórsæja krufningu á öllum tilraunadýrunum (einnig þeim sem drepast í prófuninni eða eru tekin úr henni af ástæðum er varða velferð dýra). Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar fyrir hvert dýr. Einnig er hægt að fá gagnlegar upplýsingar með smásjárrannsókn á líffærum, þar sem stórsæjar, meinafræðilegar breytingar sjást, úr dýrum sem halda lífi í 24 klukkustundir eða lengur eftir gjöf upphafsskammts.

2. **GÖGN**

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi þeirra dýra sem eru notuð, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, dauðastund hvers dýrs, lýsing á eiturhrifum, tímaframvindu þeirra og hvort þau ganga til baka og niðurstöður úr krufningu.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við á:

Prófunarefni:

— eðlisástand, hreinleiki og, ef við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar (þ.m.t. hverfing (e. *isomerisation*)),

— auðkennisgögn, þ.m.t. CAS-númer.

Burðarefni (ef við á):

— rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna (og, eftir því sem við á, rök fyrir því að nota karldýr í stað kvendýra),

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, þ.m.t. um eðlisástand efnisins sem er gefið,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið, þ.m.t. um skammtastærðir og tíma skammtagjafar,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns),

— rök fyrir vali á upphafsskammti.

Niðurstöður:

— töflusetning gagna yfir svörun og skammtastærð fyrir hvert dýr (þ.e. dýr sem sýna merki um eiturhrif, þ.m.t. dauðsföll, eðli áhrifanna, hve alvarleg þau eru og hve lengi þau vara),

— töflusetning gagna yfir líkamsþyngd og breytingar á líkamsþyngd,

— þyngd hvers dýrs daginn sem því er gefinn skammturinn, vikulega eftir það og þegar það drepst eða er aflífað,

— dauðadægur og dauðastund ef dýrin hafa drepist áður en átti að aflífa þau samkvæmt áætlun.

— tímaframvinda eiturhrifa frá því að þau koma fram og hvort þau ganga til baka, fyrir hvert dýr,

— niðurstöður krufningar og vefjameinafræðilegar niðurstöður fyrir hvert dýr, liggi þær fyrir.

Umræða og túlkun niðurstaðna.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984) Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, bls. 85-92.

2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O (1987) Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, bls. 279-291.

3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P (1990) The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, bls. 469-482.

4) Whitehead, A. and Curnow, R.N (1992) Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, bls. 313-324.

5) Stallard, N. and Whitehead, A (1995) Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, bls. 315-323.

6) Stallard, N., Whitehead, A and Ridgeway, P. (2002) Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, bls. 183-196.

7) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris

8) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment No 19.

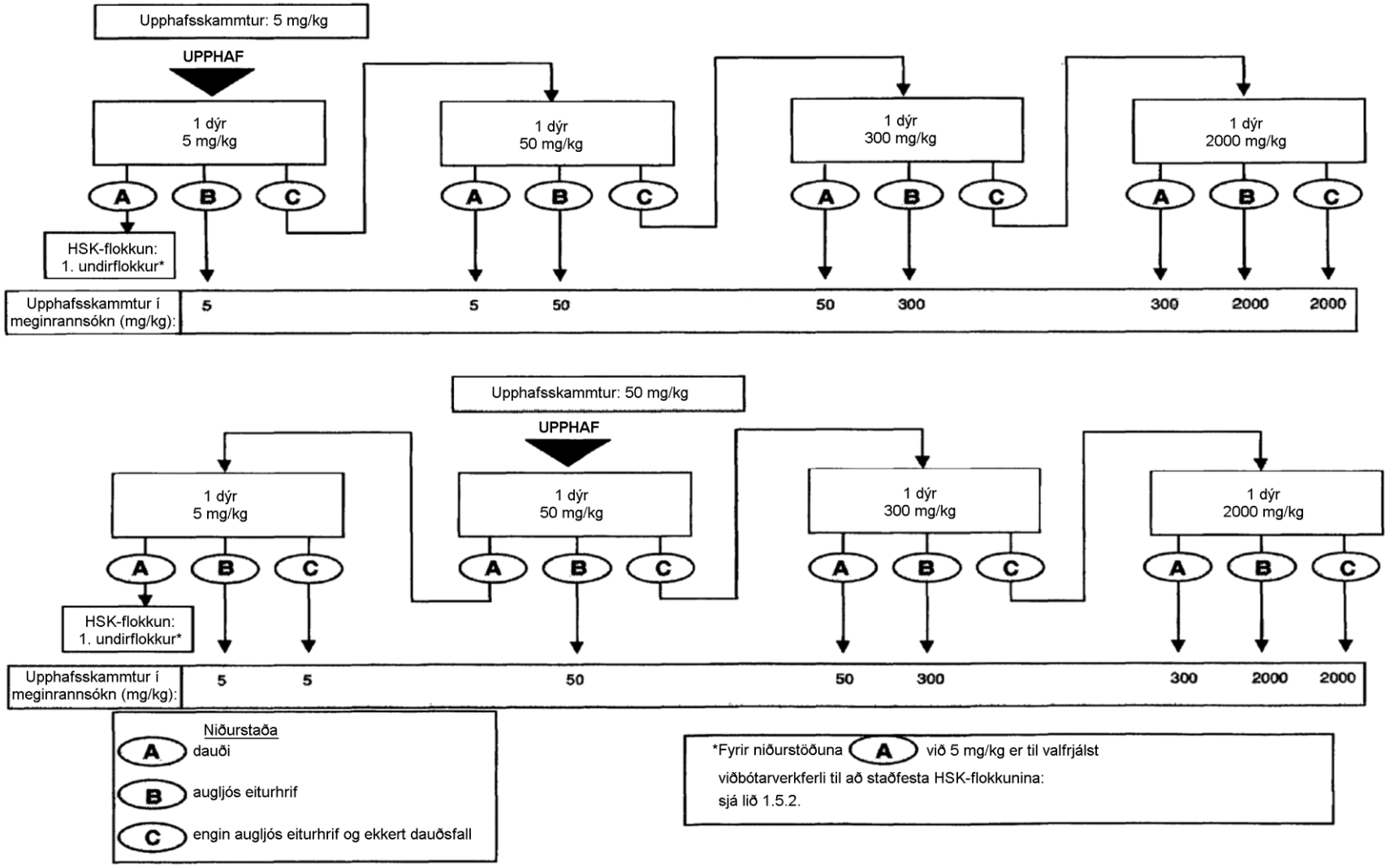
9) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, bls. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

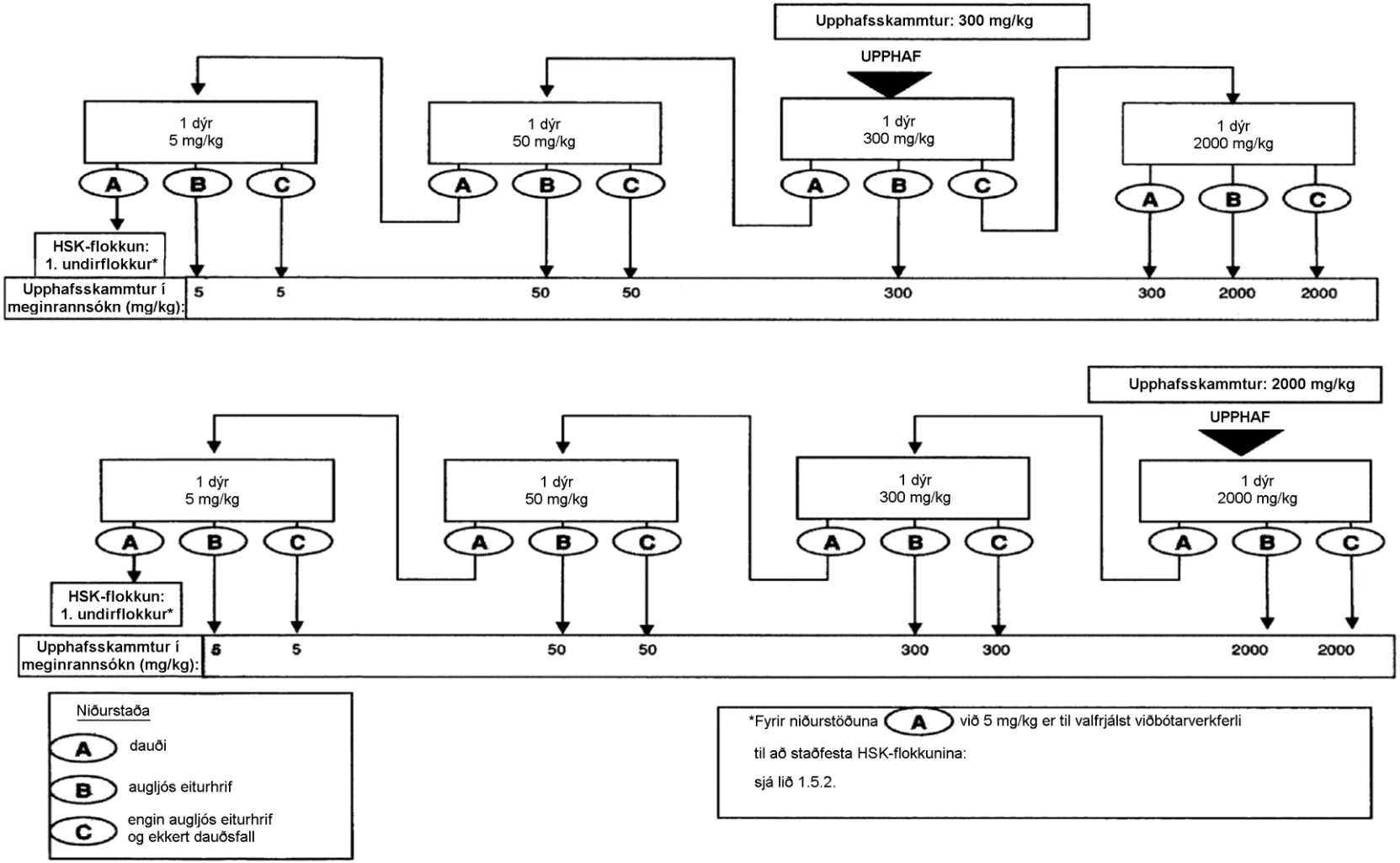
10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C (1995) Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, bls. 223-231.

11) Chan P.K and A. W Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press Ltd. New York, USA.

1. viðbætir

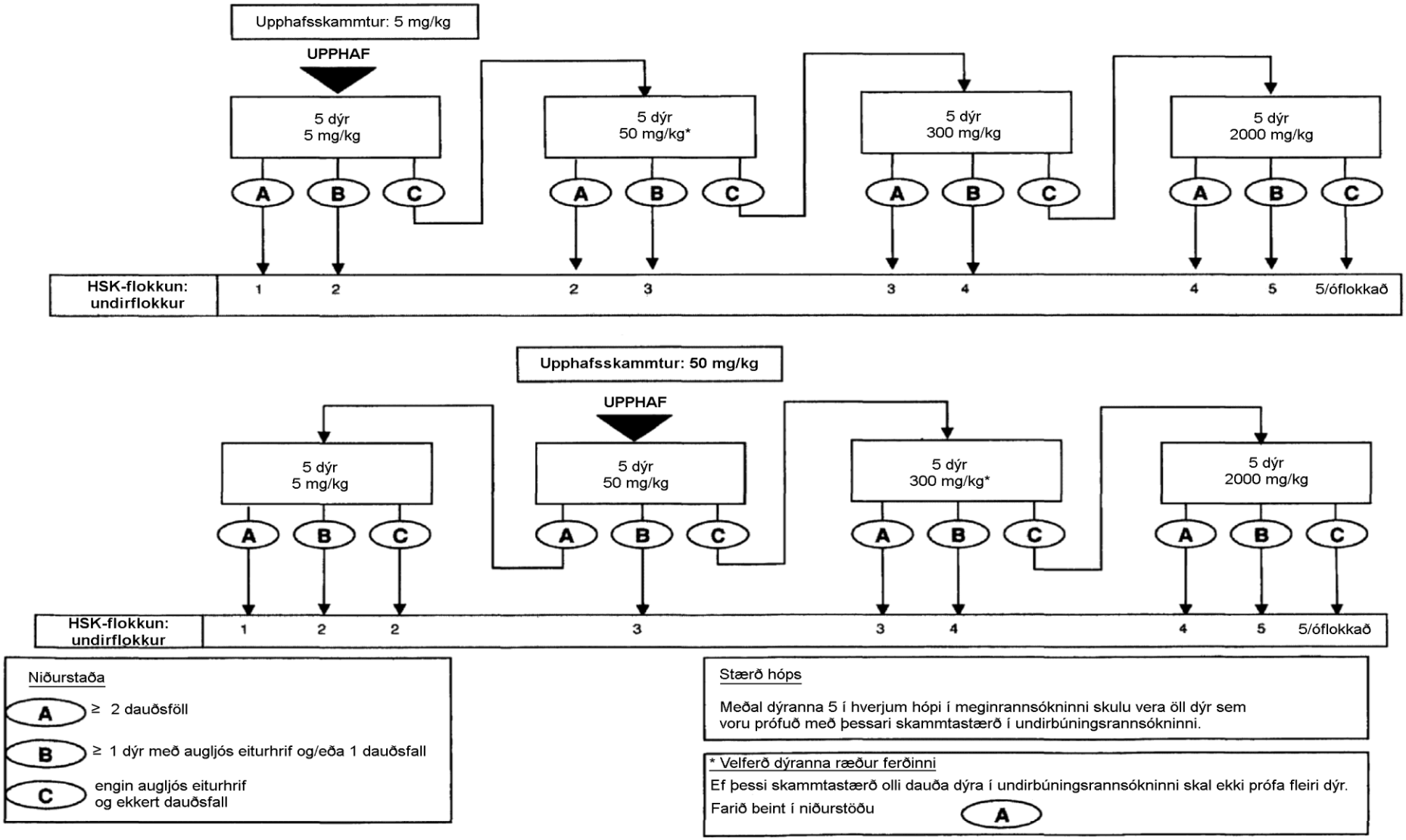
FLÆÐIRIT FYRIR UNDIRBÚNINGSRANNSÓKN

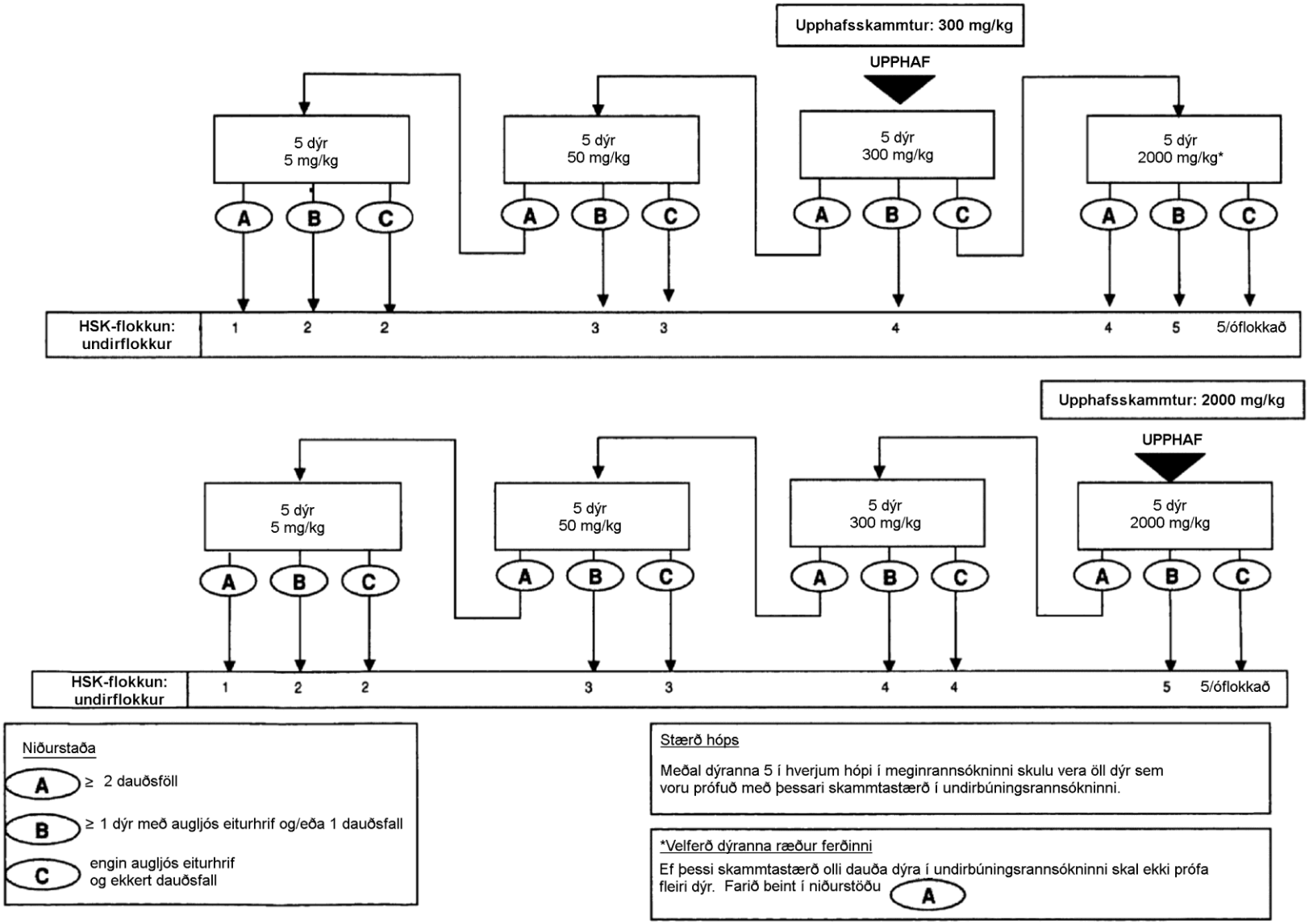



Upphafsskammtur: 300 mg/kg
UPPHAF
1 dýr
5 mg/kg
1 dýr
50 mg/kg
1 dýr
300 mg/kg
1 dýr
2000 mg/kg
A
B
C
HSK-flokkun:
1. undirflokkur*
Upphafsskammtur í meginrannsókn (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Upphafsskammtur: 2000 mg/kg
UPPHAF
1 dýr
5 mg/kg
1 dýr
50 mg/kg
1 dýr
300 mg/kg
1 dýr
2000 mg/kg
HSK-flokkun:
1. undirflokkur*
Upphafsskammtur í meginrannsókn (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Niðurstaða
A dauði
B augljós eiturhrif
C engin augljós eiturhrif og ekkert dauðsfall
*Fyrir niðurstöðuna A við 5 mg/kg er til valfrjálst viðbótarverkferli til að staðfesta HSK-flokkunina:
sjá lið 1.5.2.

2. viðbætir

FLÆÐIRIT FYRIR MEGINRANNSÓKN




Upphafsskammtur: 300 mg/kg
UPPHAF
5 dýr 5 mg/kg
5 dýr 50 mg/kg
5 dýr 300 mg/kg
5 dýr 2000 mg/kg*
A B C
HSK-flokkun: undirflokkur
1 2 2 3 3 4 4 5 5/óflokkað
Upphafsskammtur: 2000 mg/kg
UPPHAF
5 dýr 5 mg/kg
5 dýr 50 mg/kg
5 dýr 300 mg/kg
5 dýr 2000 mg/kg
A B C
HSK-flokkun: undirflokkur
1 2 2 3 3 4 4 5 5/óflokkað
Niðurstaða
A ≥ 2 dauðsföll
B ≥ 1 dýr með augljós eiturhrif og/eða 1 dauðsfall
C engin augljós eiturhrif og ekkert dauðsfall
Stærð hóps
Meðal dýranna 5 í hverjum hópi í meginrannsókninni skulu vera öll dýr sem voru prófuð með þessari skammtastærð í undirbúningsrannsókninni.
*Velferð dýranna ræður ferðinni
Ef þessi skammtastærð olli dauða dýra í undirbúningsrannsókninni skal ekki prófa fleiri dýr. Farið beint í niðurstöðu A

3. viðbætir

VIÐMIÐANIR FYRIR FLOKKUN PRÓFUNAREFNA SEM ERU MEÐ VÆNT LD_{50}-GILDI YFIR 2000 MG/KG OG SEM EKKI ÞARF AÐ PRÓFA

Viðmiðunum fyrir 5. hættuundirflokk er ætlað að auðvelda sanngreiningu prófunarefna sem tiltölulega lítil hætta er á að hafi bráð eiturhrif en geta við tilteknar aðstæður verið hættuleg viðkvæmum þýðum. Talið er að LD_{50}-gildi þessara efna við inngjöf um munn eða áburð á húð sé á bilinu 2000–5000 mg/kg eða sambærilegir skammtar fyrir aðrar íkomuleiðir. Prófunarefni mætti flokka í hættuundirflokk, sem er skilgreindur með 2000 mg/kg < LD_{50} < 5000 mg/kg (5. undirflokkur HSK), í eftirfarandi tilvikum:

a) ef það er fellt undir þennan undirflokk, samkvæmt einhverju prófunarkerfanna í 2. viðbæti, byggt á fjölda dauðsfalla,

b) ef til eru áreiðanlegar vísbendingar um að LD_{50}-gildið liggi á gildissviði 5. undirflokks eða ef aðrar dýrarannsóknir eða eiturhrif í mönnum benda til þess að heilbrigði manna sé bráð hætta búin,

c) með framreikningi, mati eða mælingum á gögnum ef ekki er ástæða til að skipa því í hærri hættuflokk og — fyrir liggja áreiðanlegar upplýsingar, sem benda til töluverðra eiturhrifa í mönnum, eða

— dýr drepast þegar prófað er með inngjöf um munn upp að gildum sem svara til 4. undirflokks eða

— ef sérfræðiálit staðfestir veruleg, klínísk merki um eiturhrif þegar prófað er upp að gildum sem samsvara 4. undirflokki nema um sé að ræða niðurgang, hárris eða óhrjálegt útlit eða

— ef sérfræðiálit staðfestir áreiðanleika upplýsinga úr öðrum dýrarannsóknum sem benda til möguleika á verulegum bráðahrifum.

PRÓFUN MEÐ SKAMMTASTÆRÐUM YFIR 2000 MG/KG

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skírskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, kemur til greina að nota fastan viðbótarskammt á efri mörkunum 5000 mg/kg. Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki sé prófað með 5000 mg/kg enda skuli slík prófun einvörðungu yfirveguð ef miklar líkur eru á því að niðurstöður hennar hafi beina þýðingu fyrir verndun heilbrigðis manna og dýra (9. heimild).

Undirbúningsrannsókn

Reglurnar um ákvarðanatöku, sem gilda um raðbundnu aðferðina sem er birt í 1. viðbæti, eru látnar ná til skammtastærðarinnar 5000 mg/kg. Þetta þýðir að þegar notaður er upphafsskammturinn 5000 mg/kg í undirbúningsrannsókn og niðurstaðan er A (dauði) þarf að prófa annað dýr með 2000 mg/kg en niðurstöðurnar B eða C (augljós eiturhrif eða engin eiturhrif) gera kleift að velja 5000 mg/kg sem upphafsskammt meginrannsóknarinnar. Á sama hátt gildir, ef notaður er annar upphafsskammtur en 5000 mg/kg, að farið skal upp í 5000 mg/kg í prófuninni ef niðurstöðurnar B eða C fást við 2000 mg/kg og gefi 5000 mg/kg síðan niðurstöðuna A skal upphafsskammtur í meginrannsókninni vera 2000 mg/kg en fáist niðurstöðurnar B og C skal upphafsskammturinn í meginrannsókninni vera 5000 mg/kg.

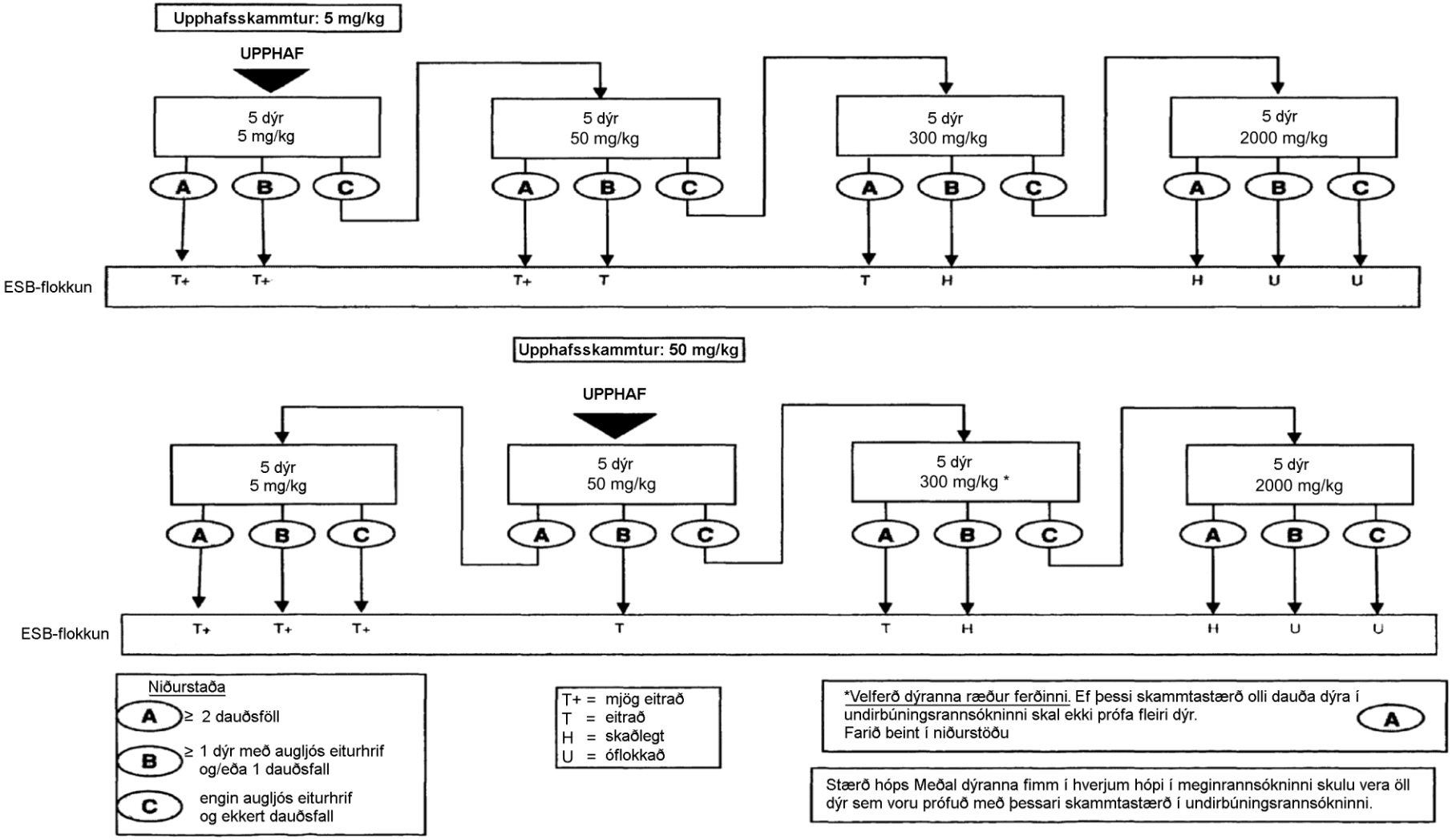
Meginrannsókn

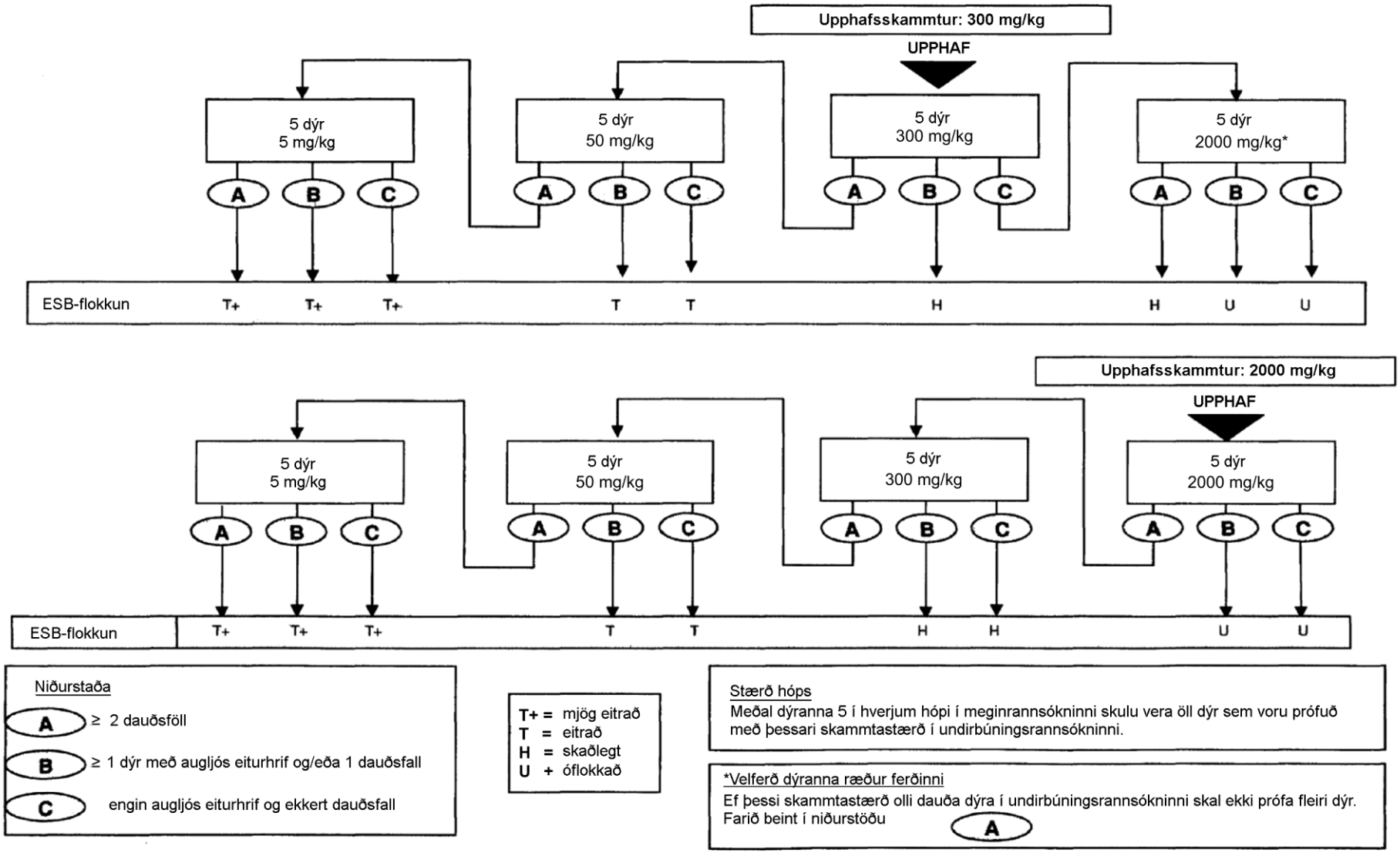
Reglurnar um ákvarðanatöku, sem gilda um raðbundnu aðferðina sem er birt í 2. viðbæti, eru látnar ná til skammtastærðarinnar 5000 mg/kg. Þetta þýðir að þegar notaður er upphafsskammturinn 5000 mg/kg í meginrannsókninni og niðurstaðan er A (≥ 2 dauðsföll) þarf að prófa annan hóp með 2000 mg/kg en niðurstaðan B (augljós eiturhrif og/eða ≤1 dauðsfall) eða C (engin eiturhrif) leiða til þess að efnið verður ekki flokkað samkvæmt hnattsamræmda kerfinu. Á sama hátt gildir, ef notaður er annar upphafsskammtur en 5000 mg/kg, að farið skal upp í 5000 mg/kg í prófuninni ef niðurstaðan C fæst við 2000 mg/kg og gefi 5000 mg/kg síðan niðurstöðuna A leiðir það til þess að efnið er sett í 5. undirflokk samkvæmt hnattsamræmda kerfinu og niðurstaðan B eða C leiðir til þess að efnið verður ekki flokkað.

4. viðbætir

PRÓFUNARAÐFERÐ B.1a

Leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu á umbreytingartímabili fram að fullri innleiðingu hnattsamræmda kerfisins (HSK (e. *GHS*)) (tekið upp úr 8. heimild)




Upphafsskammtur: 300 mg/kg
UPPHAF
5 dýr
5 mg/kg
5 dýr
50 mg/kg
5 dýr
300 mg/kg
5 dýr
2000 mg/kg*
A
B
C
ESB-flokkun
T+ T+ T+ T T H H U U
Upphafsskammtur: 2000 mg/kg
UPPHAF
5 dýr
5 mg/kg
5 dýr
50 mg/kg
5 dýr
300 mg/kg
5 dýr
2000 mg/kg
ESB-flokkun
T+ T+ T+ T T H H U U
Niðurstaða
A ≥ 2 dauðsföll
B ≥ 1 dýr með augljós eiturhrif og/eða 1 dauðsfall
C engin augljós eiturhrif og ekkert dauðsfall
T+ = mjög eitrað
T = eitrað
H = skaðlegt
U + óflokkað
Stærð hóps
Meðal dýranna 5 í hverjum hópi í meginrannsókninni skulu vera öll dýr sem voru prófuð með þessari skammtastærð í undirbúningsrannsókninni.
*Velferð dýranna ræður ferðinni
Ef þessi skammtastærð olli dauða dýra í undirbúningsrannsókninni skal ekki prófa fleiri dýr. Farið beint í niðurstöðu
A

B.1b. BRÁÐ EITURHRIF UM MUNN — AÐFERÐ TIL AÐ ÁKVARÐA FLOKKA BRÁÐRA EITURHRIFA

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 423 um prófanir (2001)

1.1. INNGANGUR

Aðferðin til að ákvarða flokka bráðra eiturhrifa (1. heimild), sem sett er fram í þessari prófun, er þrepskipt aðferð þar sem notuð eru þrjú dýr af sama kyni á hverju þrepi. Til að unnt sé að dæma um bráð eiturhrif prófunarefnisins þarf að meðaltali tvö til fjögur þrep en það fer eftir hlutfalli dauðra og/eða dauðvona dýra. Þessi aðferð er samanburðarnákvæm, útheimtir mjög fá dýr og gerir það kleift að flokka efnin á svipaðan hátt og gert er með öðrum aðferðum til prófunar á bráðum eiturhrifum. Aðferðin til að ákvarða flokka bráðra eiturhrifa byggist á líftölfræðilegu mati (2.–5. heimild) með föstum skömmtum með nægilegu millibili til að unnt sé að taka ákvörðun um röðun efnisins með tilliti til flokks og hættumats. Aðferðin, sem var samþykkt 1996, fékk víðtæka fullgildingu í prófunum í lífi með hliðsjón af LD_{50}-gögnum úr rituðum heimildum, bæði á innlendum vettvangi (6. heimild) og alþjóðavettvangi (7. heimild).

Í leiðbeiningarskjalinu um prófun á bráðum eiturhrifum um munn (8. heimild) er að finna leiðbeiningar um val á heppilegustu prófunaraðferðinni fyrir tiltekið markmið. Í leiðbeiningarskjalinu eru líka viðbótar-upplýsingar um framkvæmd og túlkun prófunaraðferðar B.1b.

Ekki þarf að gefa skammta sem vitað er að valda verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða mjög ertandi verkunar. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um sársauka eða mikla og viðvarandi þjáningu, skal aflífa á mannúðlegan hátt og fara eins með þau við túlkun prófunarniðurstaðna og dýr sem drepast í prófuninni. Fjallað er um viðmiðanir fyrir ákvörðun um að aflífa dýr, sem eru dauðvona eða sárþjáð, og gefnar leiðbeiningar um greiningu fyrirsjáanlegs eða yfirvofandi dauða í sérstöku leiðbeiningarskjali (9. heimild).

Aðferðin felur í sér notkun fyrirframskilgreindra skammta og niðurstöðurnar gera kleift að skipa efninu í flokk samkvæmt hnattsamræmda kerfinu til flokkunar á íðefnum sem valda bráðum eiturhrifum (10. heimild)

Að meginreglu til er tilgangurinn með aðferðinni ekki sá að reikna LD_{50}-gildið nákvæmlega en hún gefur kost á að ákvarða afmörkuð váhrifasvið þar sem vænta má banvæni þar eð dauði tiltekins hlutfalls dýranna er enn helsti endapunktur þessarar prófunar. Einungis er unnt að ákvarða LD_{50}-gildi með þessari aðferð ef a.m.k. tvær skammtastærðir leiða til hærra dánarhlutfalls en 0% og lægra en 100%. Þar eð prófunin er alltaf framkvæmd með fyrirframskilgreindum skammtastærðum, án tillits til prófunarefnis, og flokkunin er ótvírætt bundin fjölda tilraunadýranna í mismunandi ástandi aukast möguleikarnir á samræmi í prófunarskýrslum og endurtekningarnákvæmni milli rannsóknarstofa.

Rannsóknarstofan skal skoða allar fáanlegar upplýsingar um prófunarefnið áður en rannsóknin hefst. Þetta eru upplýsingar um auðkenni og efnafræðilega byggingu efnisins, eðlisefnafræðilega eiginleika þess, niðurstöður úr eiturhrifaprófunum á efninu í glasi og í lífi, eiturefnafræðileg gögn um efni með skylda byggingu og upplýsingar um fyrirhugaða notkun efnisins. Þessar upplýsingar eru nauðsynlegar til að fullvissa alla hlutaðeigandi aðila um að prófunin skipti máli fyrir heilbrigðisvernd manna og komi að gagni við val á heppilegasta upphafsskammtinum.

1.2. SKILGREININGAR

Bráð eiturhrif um munn: vísar til skaðlegra áhrifa sem koma fram eftir inngjöf um munn á einum skammti efnis eða mörgum skömmtum sem gefnir eru á innan við 24 klukkustundum.

Síðkominn dauði: merkir að tilraunadýrið drepst hvorki né virðist dauðvona innan 48 klukkustunda en drepst síðar á 14 daga athugunartímabilinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg).

HSK (e. GHS): Hnattsamræmt flokkunarkerfi fyrir efni og efnablöndur. Þessir aðilar unnu í sameiningu að kerfinu: Efnahags- og framfarastofnunin (heilbrigði manna og umhverfið), sérfræðinganefnd Sameinuðu þjóðanna um flutning á hættulegum varningi (eðlisefnafræðilegir eiginleikar) og Alþjóða-vinnumálastofnunin (hættutilkynningar) og fór samræming verksins fram innan ramma millistofnana-áætlunarinnar um örugga stjórnun á íðefnum (IOMC).

Yfirvofandi dauði: þegar þess er vænst að dýr verði að dauða komið eða dautt fyrir næsta áætlaða athugunartíma. Merki um slíkt ástand hjá nagdýrum geta verið krampar, hliðarlega, liggjandi staða og skjálfti (sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild)).

LD_{50} (miðgildisbanaskammtur við inngjöf um munn): tölfræðilega reiknaður, stakur skammtur efnis sem búast má við að valdi dauða 50% tilraunadýranna þegar hann er gefinn um munn. LD_{50}-gildið er sett fram sem þyngd prófunarefnis á þyngdareiningu tilraunadýrs (mg/kg).

Háskammtur: skammtur við efri mörk prófunarinnar (2000 eða 5000 mg/kg).

Dauðvona dýr: dýr sem er deyjandi eða á sér engar lífslíkur þótt það verði meðhöndlað (sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild).

Fyrirsjáanlegur dauði: þegar fyrir hendi eru klínísk merki sem benda til þess að dýrið muni deyja á tilteknum tíma fyrir lok tilraunarinnar en dæmi um slík merki eru að dýrið getur hvorki náð til vatns eða fóðurs. (Sjá nánar í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild).

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Grundvöllur prófunarinnar, sem byggist á þrepskiptri aðferð þar sem notuð eru sem fæst tilraunadýr á hverju þrepi, er að afla nægra upplýsinga um bráð eiturhrif efnisins svo að unnt sé að flokka það. Einn af föstum skömmtum efnisins er gefinn hópi tilraunadýra um munn. Efnið er prófað samkvæmt þrepskiptri aðferð og þrjú tilraunadýr af sama kyni (venjulega kvendýr) notuð á hverju þrepi. Það hvort efnistengd dauðsföll verða eða verða ekki hjá dýrum, sem fá efnisskammt á tilteknu þrepi, ræður næsta þrepi, þ.e.a.s.:

— ekki er þörf á frekari prófun,

— þremur dýrum til viðbótar er gefinn sami skammtur,

— þremur dýrum til viðbótar er gefinn næsti skammtur fyrir ofan eða neðan.

Prófunarferlinu er lýst ítarlega í 1. viðbæti. Þessi aðferð gerir kleift að flokka efnið í einn af eiturhrifaflokkunum sem eru ákvarðaðir með föstum LD_{50}-þröskuldsgildum.

1.4. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.4.1. **Val á dýrategund**

Rottur eru ákjósanlegasta nagdýrategundin þótt nota megi aðrar tegundir nagdýra. Venjulega eru kvendýr notuð (9. heimild). Ástæðan er sú að kannanir á rituðum heimildum um hefðbundnar LD_{50}-prófanir sýna að þótt lítill munur sé á næmi kynjanna eru kvendýrin að jafnaði örlitlu næmari ef slíkur munur mælist á annað borð (11. heimild). Ef upplýsingar um eiturefnafræðilega eða eiturhvarfafræðilega eiginleika efna með skylda byggingu benda til þess að karldýrin kunni að vera næmari er rétt að nota það kyn. Séu prófanirnar gerðar á karldýrum skal færa gild rök fyrir því.

Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Við upphaf skammtagjafar skal aldur einstakra dýra vera á bilinu 8–12 vikur og þyngd þeirra ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd dýra sem hafa áður fengið skammta af efninu.

1.4.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 ºC). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Hafa má nokkur dýr, sem fá sömu skammtastærð, saman í búri en ekki fleiri en svo að hægt sé að fylgjast vel með hverju dýri.

1.4.3. **Dýrin undirbúin**

Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en skammtagjöf hefst til að þau venjist umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4. **Tilreiðsla skammta**

Að öllu jöfnu skal gefa mismunandi skammta af prófunarefnum með sama rúmmáli en í breytilegum styrk. Ef prófa á efni í vökvaformi eða blöndu kann þó að henta betur að nota prófunarefnið óþynnt, þ.e. í föstum styrk, við eftirfylgjandi áhættumat á því efni enda gera sum stjórnvöld kröfu um slíkt. Í hvorugu tilvikinu má gefa meira en sem nemur rúmmáli hámarksskammtsins. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Þegar um nagdýr er að ræða ætti rúmmálið að jafnaði ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar en þó geta 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina fyrir vatnslausnir. Mælt er með því að skammtarnir séu gefnir sem vatnslausn, svifblanda eða ýrulausn ef unnt er en að öðrum kosti, í eftirfarandi forgangsröð, sem lausn, svifblanda eða ýrulausn í olíu (t.d. maísolíu) og því næst geta lausnir með öðrum burðarefnum einnig komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Skammtarnir skulu útbúnir rétt fyrir gjöf nema stöðugleiki tilreidda efnisins á fyrirhuguðu notkunartímabili sé þekktur og hafi reynst viðunandi.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Gjöf skammta**

Prófunarefnið er gefið í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Ef svo ólíklega vill til að ekki sé hægt að gefa efnið inn í einum skammti má gefa skammtinn í nokkrum hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

Dýr skulu vera fastandi fyrir inngjöf (t.d. skulu rottur fá vatn en ekki fóður yfir nótt en mýs hins vegar fá vatn en ekki fóður í þrjár til fjórar klukkustundir). Eftir föstutímabilið skal vigta dýrin og gefa þeim síðan prófunarefnið. Þegar prófunarefnið hefur verið gefið má láta rottur fasta í þrjár til fjórar klukkustundir í viðbót en mýs í eina til tvær klukkustundir. Þegar skammti er skipt í marga hluta og hann gefinn inn á ákveðnu tímabili getur verið nauðsynlegt að gefa dýrunum fóður og vatn, eftir því hve langt tímabilið er.

1.5.2. **Fjöldi dýra og skammtastærðir**

Á hverju þrepi eru notuð þrjú dýr. Upphafsskammturinn er valinn úr fjórum föstum stærðum, þ.e. 5, 50, 300 eða 2000 mg á hvert kg líkamsþyngdar. Sem upphafsskammt skal nota þá skammtastærð sem er líklegust til að valda dauða sumra dýranna sem fá skammtinn. Á flæðiritunum í 1. viðbæti er lýst verkferlinu sem fylgja skal fyrir hvern upphafsskammt. Í 4. viðbæti eru auk þess leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu þar til nýja, hnattsamræmda kerfið verður innleitt.

Þegar ráða má af fyrirliggjandi upplýsingum að ólíklegt sé að stærsti upphafsskammtur (2000 mg/kg líkamsþyngdar) valdi dauða ber að gera markprófun. Ef engar upplýsingar eru til um prófunarefnið er mælt með því, af ástæðum sem varða velferð dýra, að nota upphafsskammtinn 300 mg/kg líkamsþyngdar.

Tíminn, sem líður á milli meðferðar hinna ýmsu hópa, ákvarðast af því hvenær merki um eiturhrif koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg þau eru. Rétt er að bíða með að gefa dýrum næsta skammt þar til vissa er fyrir því að dýrin, sem áður fengu skammt, hafi lifað af.

Í undantekningartilvikum, og þá aðeins með þeirri skírskotun að uppfylla verði tiltekin regluákvæði, kemur til greina að nota viðbótarskammt á efri mörkunum 5000 mg/kg líkamsþyngdar (sjá 2. viðbæti). Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki séu gerðar prófanir á dýrum á skammtasviði 5. undirflokks hnattsamræmda kerfisins (2000–5000 mg/kg) enda skuli slík prófun einvörðungu yfirveguð ef miklar líkur eru á því að niðurstöður hennar hafi beina þýðingu fyrir verndun heilbrigðis manna og dýra eða umhverfisvernd.

1.5.3. **Markprófun**

Markprófun er fyrst og fremst notuð þegar rannsakandinn hefur upplýsingar sem benda til þess að prófunarefnið sé óeitrað, þ.e. aðeins eitrað í skömmtum sem eru yfir lögbundnum háskömmtum. Þekking á samsvarandi, prófuðum efnasamböndum eða samsvarandi, prófuðum blöndum eða vörum getur gefið vísbendingu um eiturhrif prófunarefnisins, að teknu tilliti til tegundar og hundraðshluta innihaldsefna sem vitað er að skipta máli í eiturefnafræðilegu tilliti. Sé lítið sem ekkert vitað um eiturhrif prófunarefnisins eða sé þess vænst að prófunarefnið sé eitrað ber að framkvæma meginrannsóknina.

Framkvæma má markprófun með einni skammtastærð, sem er 2000 mg/kg líkamsþyngdar, á sex dýrum (þremur á hverju þrepi). Í undantekningartilvikum er heimilt að framkvæma markprófun með einni skammtastærð, sem er 5000 mg/kg, á þremur dýrum (sjá 2. viðbæti). Verði efnistengd dauðsföll kann að vera þörf fyrir frekari prófun á næsta þrepi fyrir neðan.

1.6. ATHUGANIR

Hvert dýr fyrir sig er athugað a.m.k. einu sinni á fyrstu 30 mínútunum eftir skammtagjöf og með reglubundnu millibili fyrstu 24 klukkustundirnar, einkum skal gefa þeim sérstakan gaum fyrstu 4 klukkustundirnar, og daglega eftir það í alls 14 daga nema nauðsynlegt reynist að taka þau úr rannsókninni og aflífa þau á mannúðlegan hátt, af ástæðum sem varða velferð dýra, eða þau deyi í rannsókninni. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og það má því lengja gerist þess þörf. Miklu skiptir hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa, einkum þegar merki um eiturhrif koma seint í ljós (12. heimild). Skrá skal allar athuganir kerfisbundið og skal halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr.

Nauðsynlegt er að gera viðbótarathuganir ef dýrin halda áfram að sýna merki um eiturhrif. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálftum, krömpum, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Taka skal mið af meginreglunum og viðmiðunum sem eru birtar í stuttu formi í leiðbeiningarskjalinu um mannúðlega endapunkta (9. heimild) Dauðvona dýr og dýr sem sýna merki um mikinn sársauka eða viðvarandi þjáningu ætti að aflífa á mannúðlegan hátt. Þegar dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum eða komið að þeim dauðum skal skrá dauðastund eins nákvæmlega og hægt er.

1.6.1. **Líkamsþyngd**

Vigta skal hvert dýr stuttu áður en prófunarefnið er gefið og a.m.k. vikulega eftir það. Þyngdarbreytingar skulu reiknaðar og skráðar. Í lok prófunarinnar skal vigta dýrin, sem eftir lifa, og aflífa þau á mannúðlegan hátt.

1.6.2. **Meinafræði**

Framkvæma ber stórsæja krufningu á öllum tilraunadýrunum (einnig þeim sem drepast í prófuninni eða eru tekin úr henni af ástæðum er varða velferð dýra). Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar fyrir hvert dýr. Einnig er hægt að fá gagnlegar upplýsingar með smásjárrannsókn á líffærum, þar sem stórsæjar, meinafræðilegar breytingar sjást, úr dýrum sem halda lífi í 24 klukkustundir eða lengur.

2. **GÖGN**

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi þeirra dýra sem eru notuð, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, dauðastund hvers dýrs, lýsing á eiturhrifum, tímaframvindu þeirra og hvort þau ganga til baka og niðurstöður úr krufningu.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. **Prófunarskýrsla**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við á:

Prófunarefni:

— eðlisástand, hreinleiki og, ef við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar (þ.m.t. hverfing (e. *isomerisation*)),

— auðkennisgögn, þ.m.t. CAS-númer.

Burðarefni (ef við á):

— rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna (ásamt rökum fyrir því að nota karldýr í stað kvendýra, eftir því sem við á),

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins, þ.m.t. um eðlisástand efnisins sem er gefið,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið, þ.m.t. um skammtastærðir og tíma skammtagjafar,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns),

— rök fyrir vali á upphafsskammti.

Niðurstöður:

— töflusetning gagna yfir svörun og skammtastærð fyrir hvert dýr (þ.e. dýr sem sýna merki um eiturhrif, þ.m.t. dauðsföll, eðli áhrifanna, hve alvarleg þau eru og hve lengi þau vara),

— töflusetning gagna yfir líkamsþyngd og breytingar á líkamsþyngd,

— þyngd hvers dýrs daginn sem því er gefinn skammturinn, vikulega eftir það og þegar það drepst eða er aflífað,

— dauðadægur og dauðastund ef dýrin hafa drepist áður en átti að aflífa þau samkvæmt áætlun.

— tímaframvinda eiturhrifa frá því að þau koma fram og hvort þau ganga til baka, fyrir hvert dýr,

— niðurstöður krufningar og vefjameinafræðilegar niðurstöður fyrir hvert dýr, liggi þær fyrir.

Umræða og túlkun niðurstaðna.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D (1986) New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, bls. 86.

2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D (1989) Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, bls. 336-341.

3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E (1994) The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, bls. 559-610.

4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E., (1995) The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, bls. 729-734.

5) Diener W., and Schlede E., (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. ALTEX 16, bls. 129-134.

6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D., (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method — An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D., (1994) The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, bls. 659-670.

8) OECD, (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. Paris.

9) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19.

10) OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, bls. 11 (http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html).

11) Lipnick R. L., Cotruvo, J.A., Hill R. N., Bruce R. D., Stitzel K. A., Walker A. P., Chu I.; Goddard M., Segal L., Springer J. A. and Myers R. C. (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, bls. 223-231.

12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

1. viðbætir

VERKFERLI SEM NOTA SKAL FYRIR HVERN UPPHAFSSKAMMT

ALMENNAR ATHUGASEMDIR

Fyrir hvern upphafsskammt er að finna lýsingu á verkferlinu, sem fylgja skal, í viðeigandi prófunaráætlun í þessum viðbæti.

— 1. viðbætir a: upphafsskammtur er 5 mg/kg líkamsþyngdar,

— 1. viðbætir b: upphafsskammtur er 50 mg/kg líkamsþyngdar,

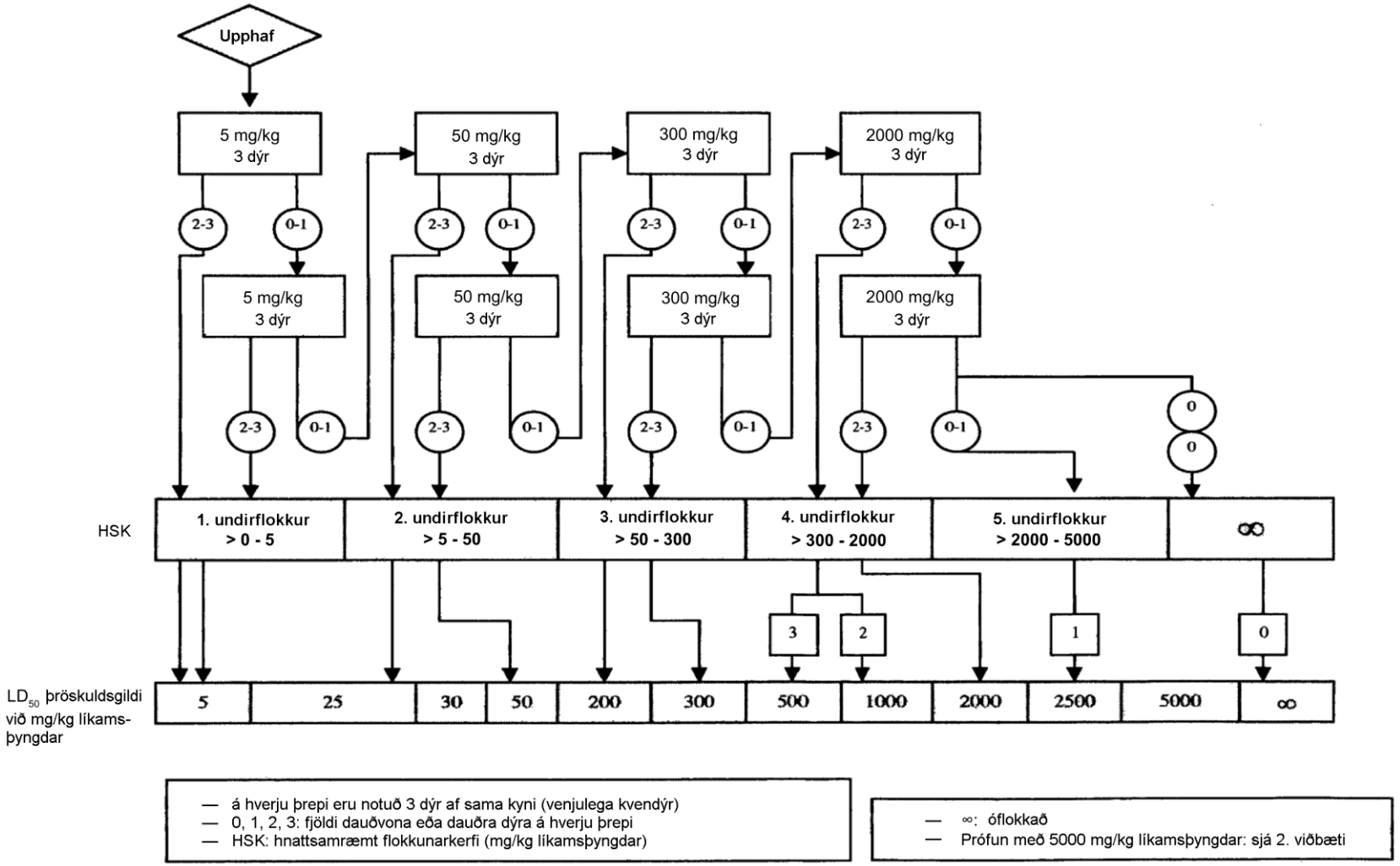
— 1. viðbætir c: upphafsskammtur er: 300 mg/kg líkamsþyngdar,

— 1. viðbætir d: upphafsskammtur er: 2000 mg/kg líkamsþyngdar.

Prófunarferlið er sýnt með örvunum og fer eftir því hve mörg dýr drepast eða eru aflífuð á mannúðlegan hátt.

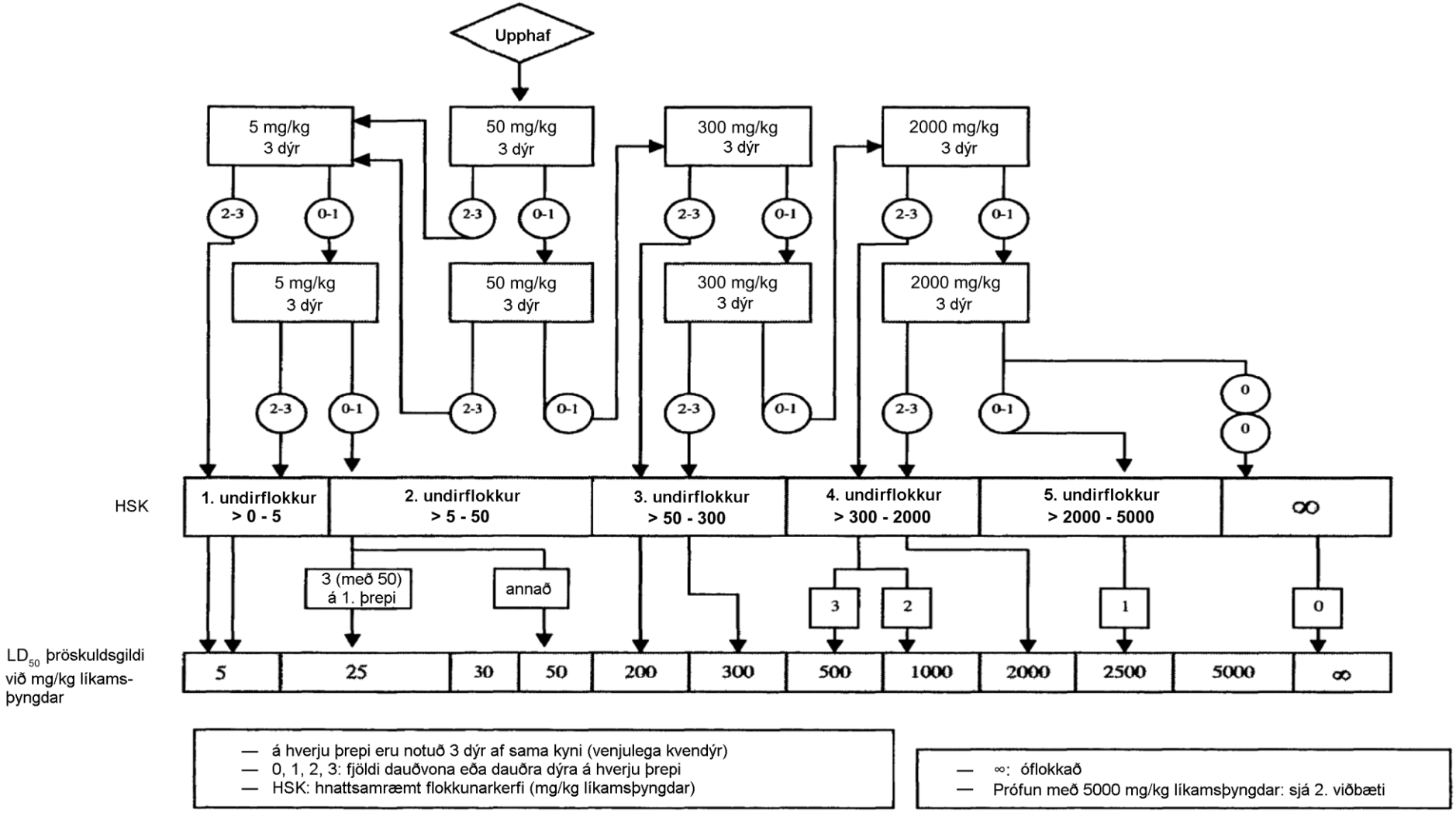
1. viðbætir A

PRÓFUNARFERLI MEÐ UPPHAFSSKAMMTINUM 5 MG/KG LÍKAMSÞYNGDAR



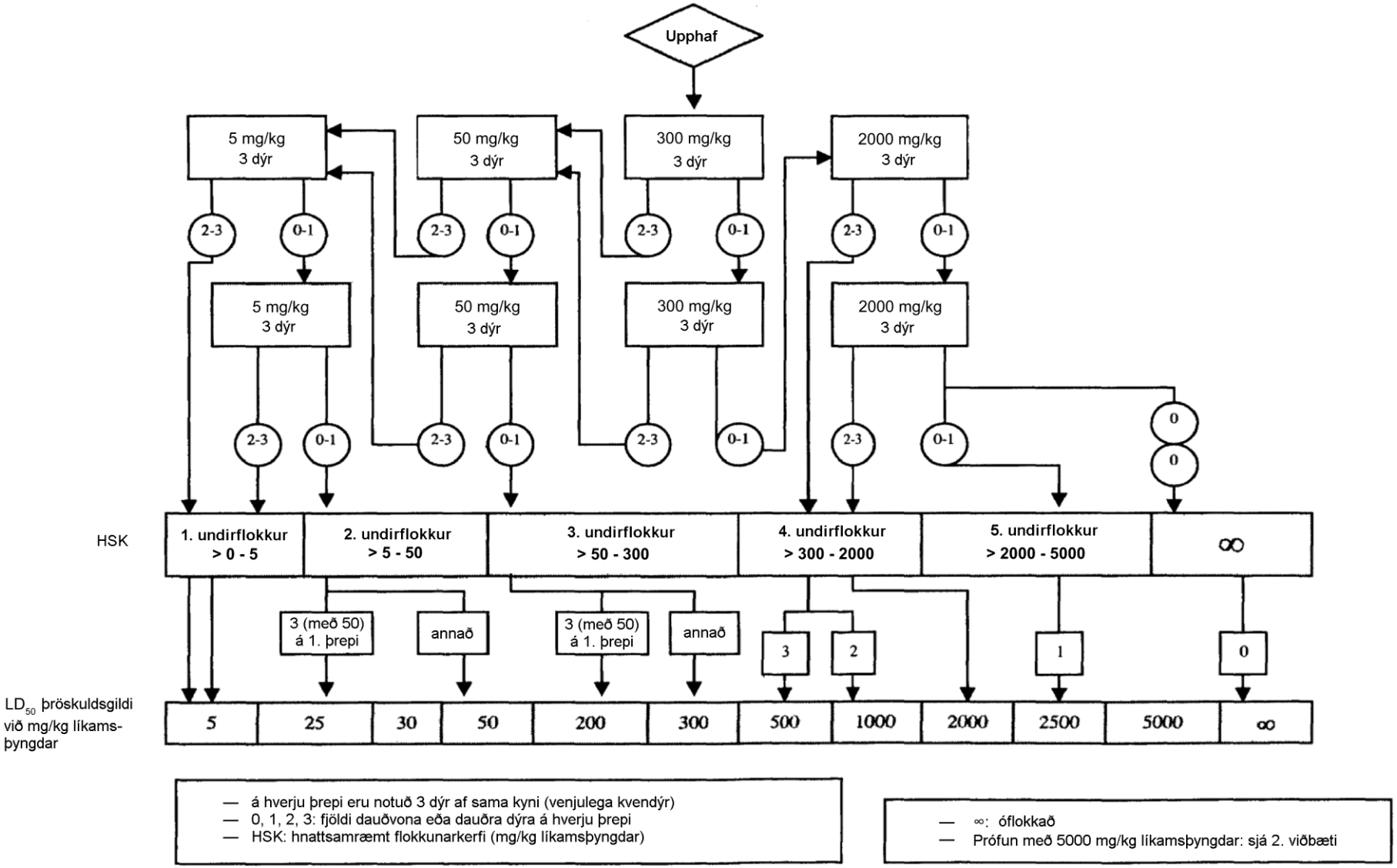
1. viðbætir B

PRÓFUNARFERLI MEÐ UPPHAFSSKAMMTINUM 50 MG/KG LÍKAMSÞYNGDAR



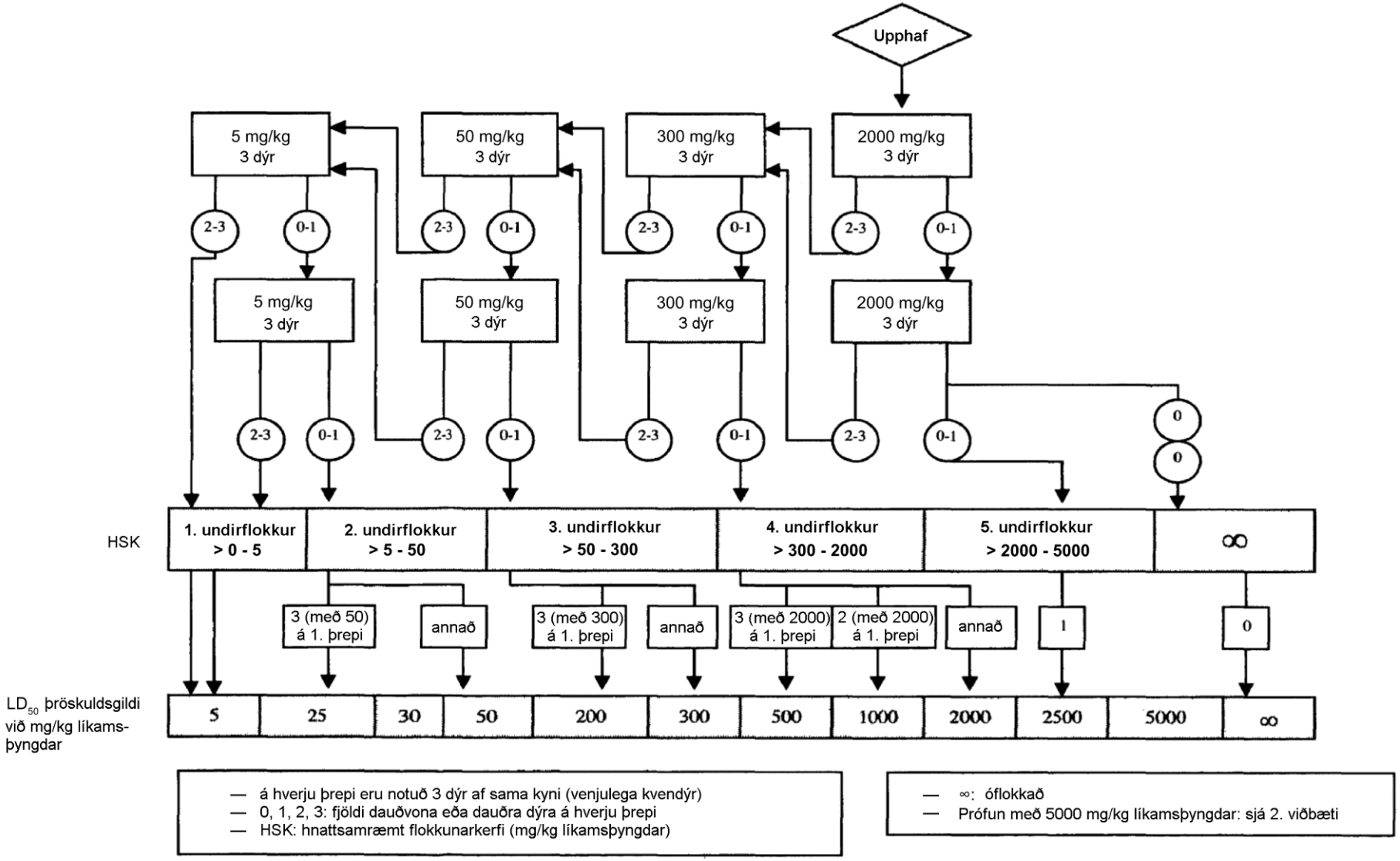
1. viðbætir C

PRÓFUNARFERLI MEÐ UPPHAFSSKAMMTINUM 300 MG/KG LÍKAMSÞYNGDAR



1. viðbætir D

PRÓFUNARFERLI MEÐ UPPHAFSSKAMMTINUM 2000 MG/KG LÍKAMSÞYNGDAR



2. viðbætir

VIÐMIÐANIR FYRIR FLOKKUN PRÓFUNAREFNA SEM ERU MEÐ VÆNT LD_{50}-GILDI YFIR 2000 MG/KG OG SEM EKKI ÞARF AÐ PRÓFA

Viðmiðunum fyrir 5. hættuundirflokk er ætlað að auðvelda sanngreiningu prófunarefna sem tiltölulega lítil hætta er á að hafi bráð eiturhrif en geta við tilteknar aðstæður verið hættuleg viðkvæmum þýðum. Talið er að LD_{50}-gildi þessara efna við inngjöf um munn eða áburð á húð sé á bilinu 2000–5000 mg/kg eða sambærilegir skammtar fyrir aðrar íkomuleiðir. Prófunarefnið skal flokka í hættuundirflokk, sem er skilgreindur með 2000 mg/kg < LD_{50} < 5000 mg/kg (5. undirflokkur HSK), í eftirfarandi tilvikum:

a) ef það er fellt undir þennan undirflokk samkvæmt einhverju prófunarkerfanna í 1. viðbæti A til 1. viðbætis D, byggt á fjölda dauðsfalla,

b) ef til eru áreiðanlegar vísbendingar um að LD_{50}-gildið liggi á gildissviði 5. undirflokks eða ef aðrar dýrarannsóknir eða eiturhrif í mönnum benda til þess að heilbrigði manna sé bráð hætta búin,

c) með framreikningi, mati eða mælingum á gögnum ef ekki er ástæða til að skipa því í hættulegri flokk og - fyrir liggja áreiðanlegar upplýsingar, sem benda til töluverðra eiturhrifa í mönnum, eða

   — dýr drepast þegar prófað er með inngjöf um munn upp að gildum sem svara til 4. undirflokks eða

   — sérfræðiálit staðfestir veruleg, klínísk merki um eiturhrif þegar prófað er upp að gildum sem samsvara 4. undirflokki nema um sé að ræða niðurgang, hárris eða óhrjálegt útlit eða

   — sérfræðiálit staðfestir áreiðanleika upplýsinga úr öðrum dýrarannsóknum sem benda til möguleika á verulegum bráðahrifum.

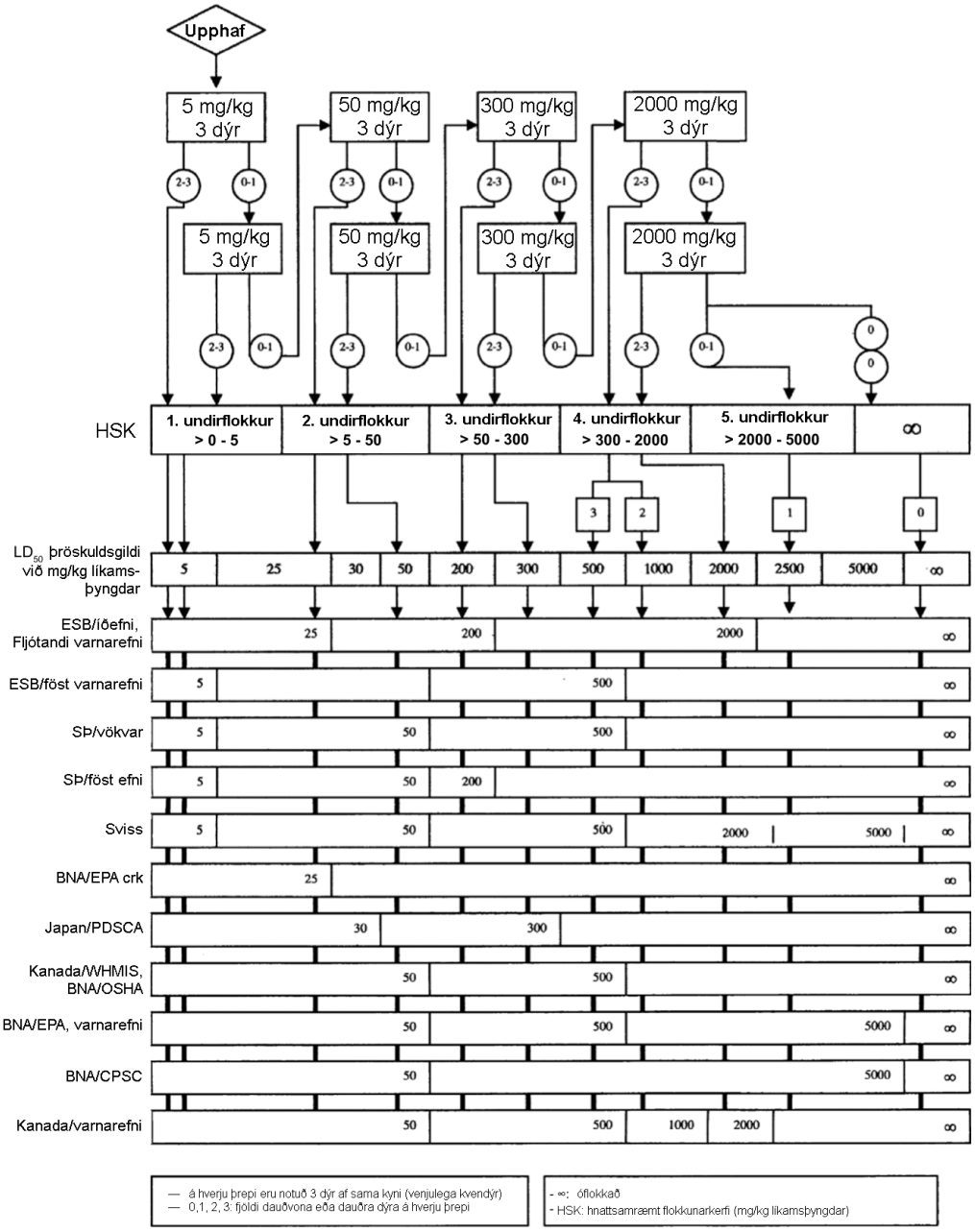
PRÓFUN MEÐ SKAMMTASTÆRÐUM YFIR 2000 MG/KG

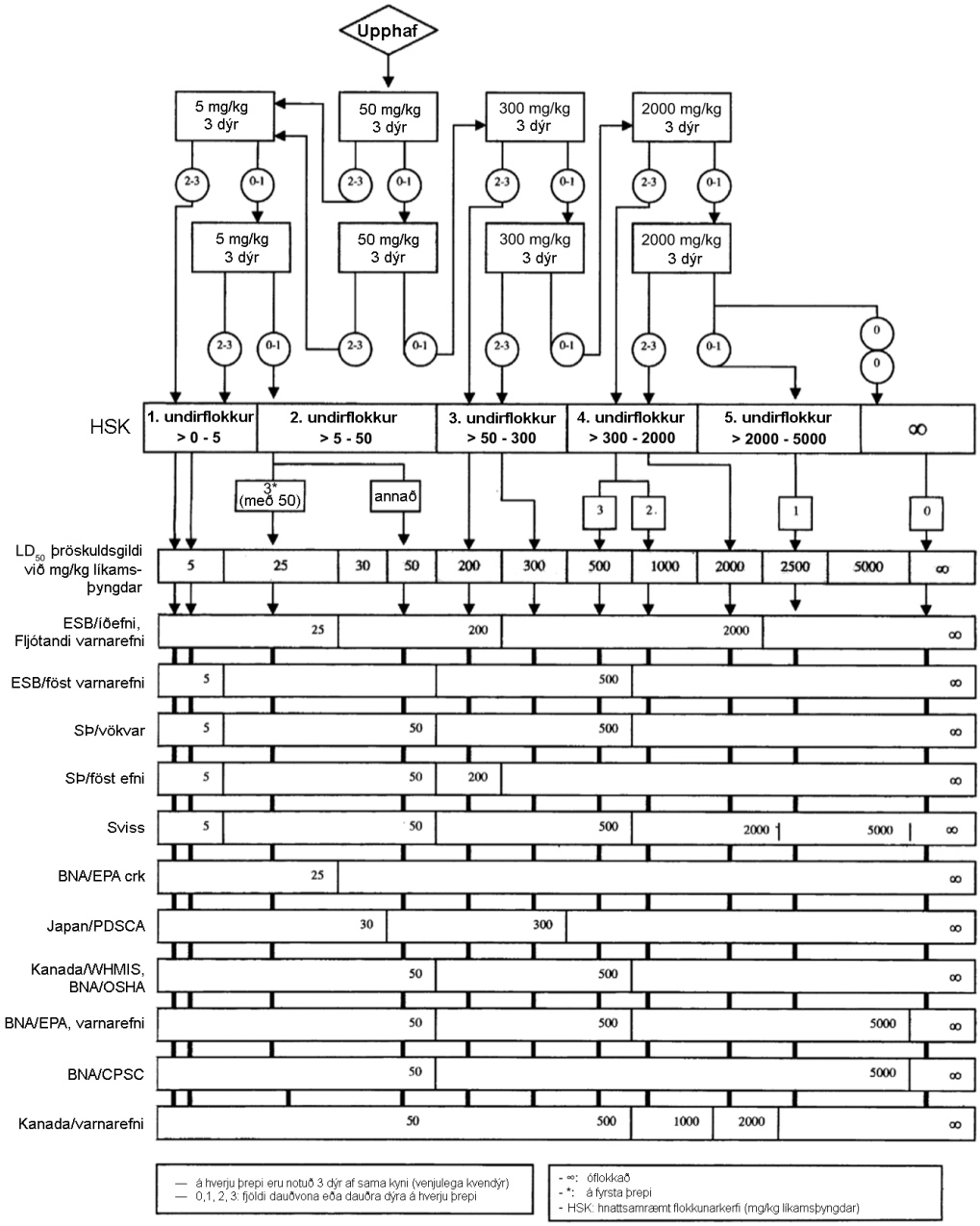
Af ástæðum, sem varða velferð dýra, er hvatt til þess að ekki séu gerðar prófanir á dýrum á sviði 5. undirflokks (5000 mg/kg) enda skuli slík prófun einvörðungu yfirveguð ef miklar líkur eru á því að niðurstöður hennar hafi beina þýðingu fyrir verndun heilbrigðis manna og dýra (10. heimild). Ekki ætti að gera frekari prófanir með stærri skömmtum.

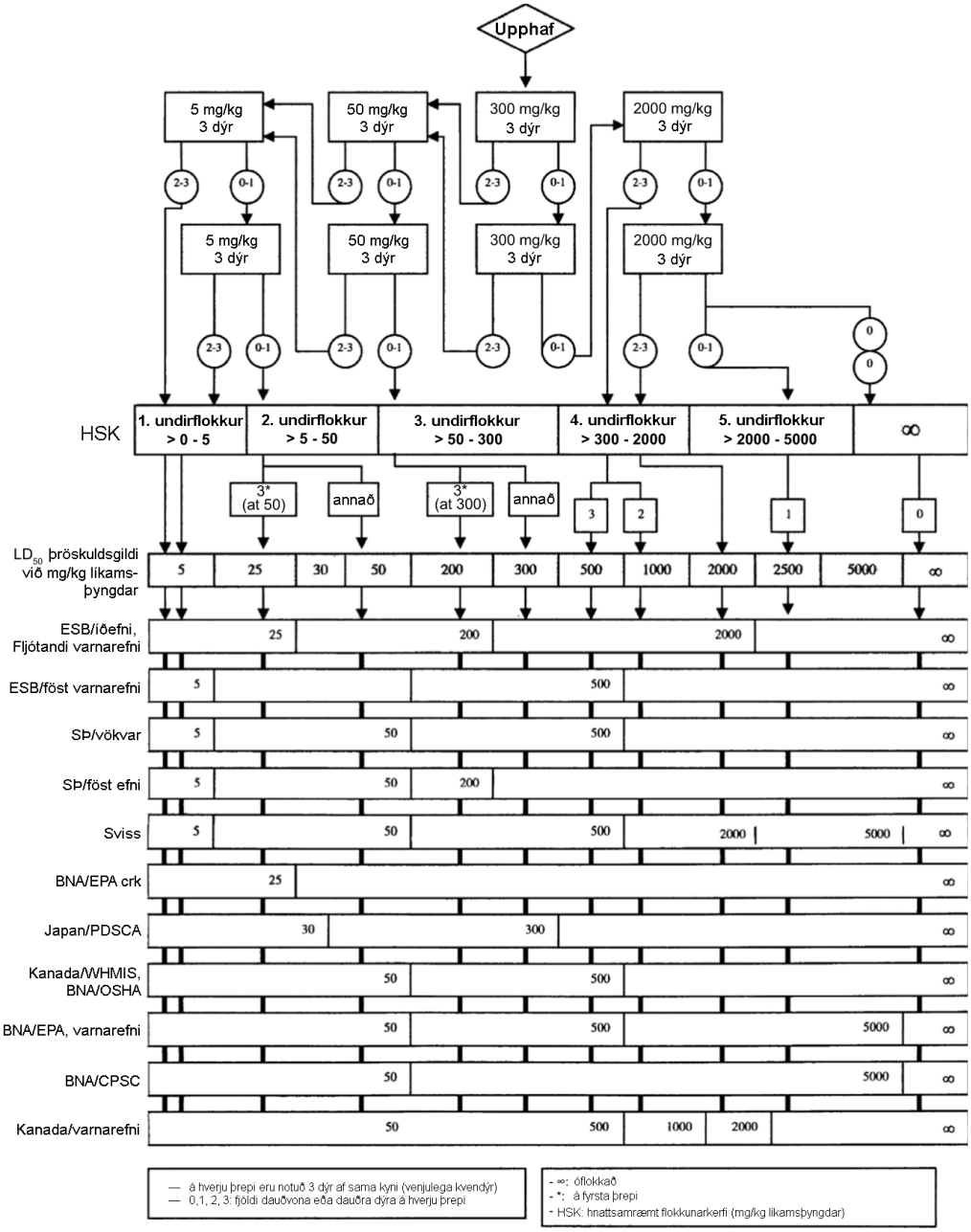
Þegar prófun er nauðsynleg er notaður skammturinn 5000 mg/kg og aðeins er þörf á einu þrepi (þ.e. þrjú dýr). Drepist fyrsta dýrið sem fær skammt er prófun haldið áfram með skammtinum 2000 mg/kg í samræmi við flæðiritin í 1. viðbæti. Haldi fyrsta dýrið lífi er tveimur dýrum til viðbótar gefinn skammturinn. Drepist aðeins eitt af dýrunum þremur er gert ráð fyrir að LD_{50}-gildið sé yfir 5000 mg/kg. Drepist bæði dýrin er prófun haldið áfram með skammtinum 2000 mg/kg.

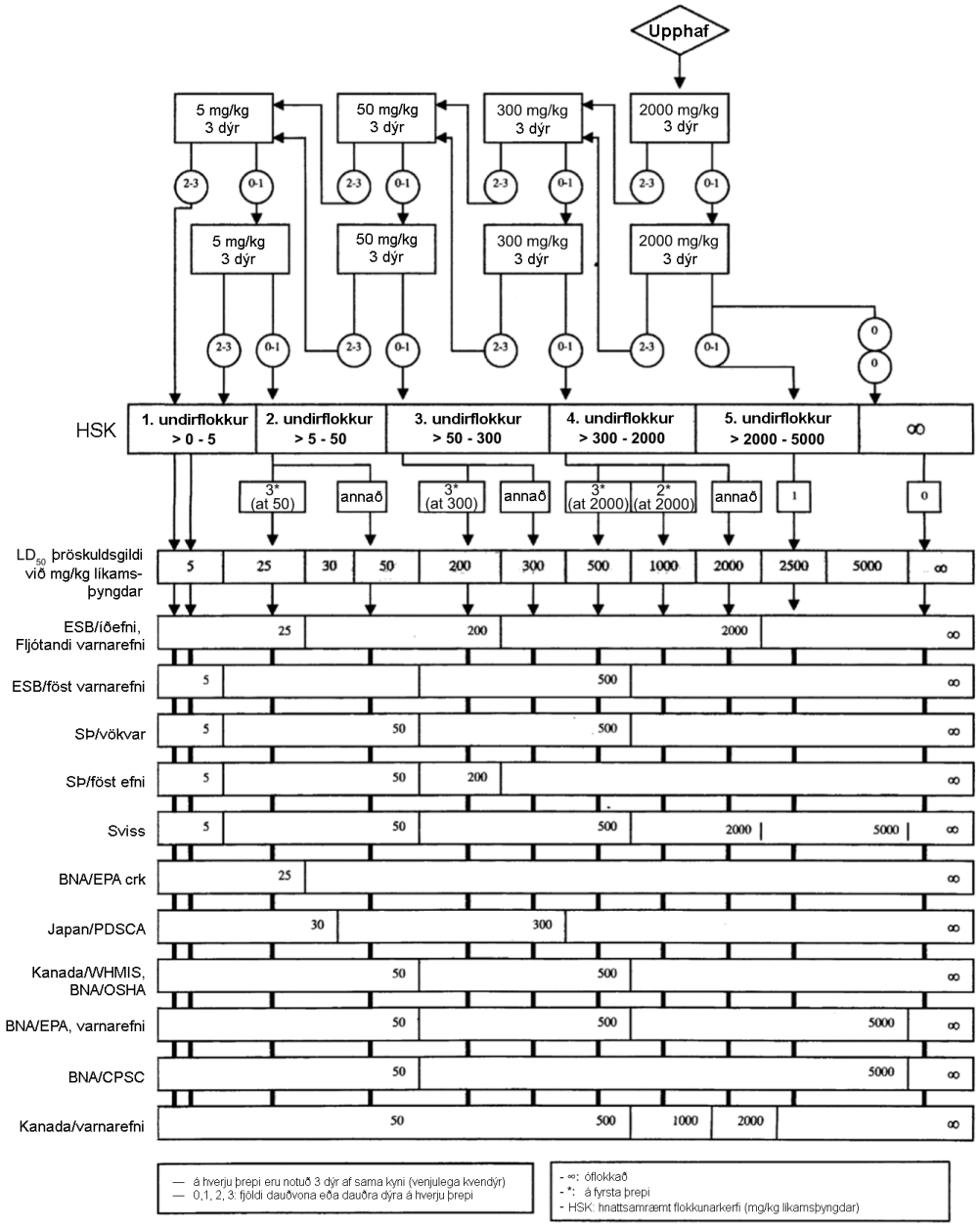
3. viðbætir

PRÓFUNARAÐFERÐ B.1b: Leiðbeiningar um flokkun samkvæmt ESB-kerfinu á umbreytingartímabili fram að fullri innleiðingu hnattsamræmda flokkunarkerfisins (HSK) (tekið upp úr 8. heimild)




Upphaf
5 mg/kg 3 dýr
50 mg/kg 3 dýr
300 mg/kg 3 dýr
2000 mg/kg 3 dýr
2-3
0-1
0
HSK
1. undirflokkur > 0 - 5
2. undirflokkur > 5 - 50
3. undirflokkur > 50 - 300
4. undirflokkur > 300 - 2000
5. undirflokkur > 2000 - 5000
∞
3* (með 50)
annað
LD50 þröskuldsgildi við mg/kg líkams-þyngdar
ESB/íðefni, Fljótandi varnarefni
ESB/föst varnarefni
SÞ/vökvar
SÞ/föst efni
Sviss
BNA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, BNA/OSHA
BNA/EPA, varnarefni
BNA/CPSC
Kanada/varnarefni
— á hverju þrepi eru notuð 3 dýr af sama kyni (venjulega kvendýr)
— 0,1, 2, 3: fjöldi dauðvona eða dauðra dýra á hverju þrepi
- ∞: óflokkað
- *: á fyrsta þrepi
- HSK: hnattsamræmt flokkunarkerfi (mg/kg líkamsþyngdar)


Upphaf
5 mg/kg 3 dýr
50 mg/kg 3 dýr
300 mg/kg 3 dýr
2000 mg/kg 3 dýr
2-3
0-1
0
HSK
1. undirflokkur > 0 - 5
2. undirflokkur > 5 - 50
3. undirflokkur > 50 - 300
4. undirflokkur > 300 - 2000
5. undirflokkur > 2000 - 5000
∞
3* (at 50)
annað
3* (at 300)
3
2
1
LD50 þröskuldsgildi við mg/kg líkams-þyngdar
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ESB/íðefni, Fljótandi varnarefni
ESB/föst varnarefni
SÞ/vökvar
SÞ/föst efni
Sviss
BNA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, BNA/OSHA
BNA/EPA, varnarefni
BNA/CPSC
Kanada/varnarefni
— á hverju þrepi eru notuð 3 dýr af sama kyni (venjulega kvendýr)
— 0,1, 2, 3: fjöldi dauðvona eða dauðra dýra á hverju þrepi
- ∞: óflokkað
- *: á fyrsta þrepi
- HSK: hnattsamræmt flokkunarkerfi (mg/kg líkamsþyngdar)


Upphaf
5 mg/kg 3 dýr
50 mg/kg 3 dýr
300 mg/kg 3 dýr
2000 mg/kg 3 dýr
2-3
0-1
0
HSK
1. undirflokkur > 0 - 5
2. undirflokkur > 5 - 50
3. undirflokkur > 50 - 300
4. undirflokkur > 300 - 2000
5. undirflokkur > 2000 - 5000
∞
3* (at 50)
annað
3* (at 300)
3* (at 2000)
2* (at 2000)
1
LD50 þröskuldsgildi við mg/kg líkams-þyngdar
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
ESB/íðefni, Fljótandi varnarefni
ESB/föst varnarefni
SÞ/vökvar
SÞ/föst efni
Sviss
BNA/EPA crk
Japan/PDSCA
Kanada/WHMIS, BNA/OSHA
BNA/EPA, varnarefni
BNA/CPSC
Kanada/varnarefni
— á hverju þrepi eru notuð 3 dýr af sama kyni (venjulega kvendýr)
— 0,1, 2, 3: fjöldi dauðvona eða dauðra dýra á hverju þrepi
- ∞: óflokkað
- *: á fyrsta þrepi
- HSK: hnattsamræmt flokkunarkerfi (mg/kg líkamsþyngdar)

B.2. **BRÁÐ EITURHRIF (INNÖNDUN)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga fyrir fram um agnastærðardreifingu efnisins, gufuþrýsting, bræðslumark, suðumark, blossamark og sprengifimi (ef við á).

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta (A-lið).

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta (B-lið).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrir hópar tilraunadýra eru látnir verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í stigskiptum styrkleikum og er notaður einn styrkleiki fyrir hvern hóp. Því næst eru athuguð þau áhrif sem koma fram, þ.m.t. dauðsföll. Dýr, sem drepast meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

Sýni dýr alvarleg og viðvarandi merki um þjáningu og sársauka getur þurft að aflífa þau á mannúðlegan hátt. Ekki er ætlast til að prófunarefni séu skömmtuð á neinn þann hátt sem vitað er að veldur verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða afar ertandi eiginleika þeirra.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir tilraunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í tilskilinn fjölda hópa. Ekki þarf að líkja eftir váhrifum á þau nema váhrifabúnaðurinn, sem er notaður, útheimti það.

Föst efni getur þurft að mylja í örfínt duft til að fá agnir af hæfilegri stærð.

Ef nauðsyn krefur má bæta hentugu burðarefni við prófunarefnið til að auðveldara verði að ná fram hæfilegum styrk prófunarefnisins í andrúmsloftinu og ætti þá að nota samanburðarhóp sem fær eingöngu burðarefni. Ef burðarefni eða önnur íblöndunarefni eru notuð til að auðvelda skömmtun verður að vera fullvíst að þau valdi ekki eiturhrifum. Nota má rannsóknarsöguleg gögn ef við á.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

1.6.2.1. *Tilraunadýr*

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin nema vitað sé um frábendingar. Nota skal algenga rannsóknar-stofustofna. Um hvort kynið um sig gildir að við upphaf prófunar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá viðeigandi meðalgildi.

1.6.2.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst 10 nagdýr (fimm kvendýr og fimm karldýr) á hverju styrkstigi. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi.

Athugasemd: ef notuð eru æðri dýr en nagdýr við prófanir á bráðum eiturhrifum skal hugað að því hvort nota megi færri dýr. Skammta skal velja af vandvirkni og leggja allt kapp á að þeir verði ekki stærri en hóflega eitraðir skammtar. Við prófanir af þessu tagi skal varast að gefa banvæna skammta af prófunarefninu.

1.6.2.3. *Váhrifastyrkleikar*

Nota skal nægilega marga váhrifastyrkleika, a.m.k. þrjá, og skulu þeir valdir þannig að stigvaxandi eiturhrif og dánarhlutfall komi fram í prófunarhópunum. Gögn skulu vera nægileg til að draga megi upp feril sem sýnir samband styrks og dánarhlutfalls og, eftir því sem unnt er, til að ákvarða LC_{50}-gildi með fullnægjandi hætti. Markprófun

1.6.2.4. *Markprófun*

Ef váhrif á fimm karldýr og fimm kvendýr frá 20 mg/l af lofttegund eða 5 mg/l af úðaefni eða svifögnum í fjórar klukkustundir (en sé það ógerlegt vegna eðlis- eða efnafræðilegra eiginleika prófunarefnisins, þ.m.t. sprengifimi, þá með mesta styrk sem næst) valda engum efnistengdum dauðsföllum innan 14 daga má líta svo á að frekari prófanir séu óþarfar.

1.6.2.5. *Váhrifatími*

Váhrifatíminn skal vera fjórar klukkustundir.

1.6.2.6. *Búnaður*

Prófa skal dýrin með innöndunarbúnaði sem er hannaður til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Ef notaður er klefi skal hanna hann þannig að ekki verði of þröngt um dýrin og þau nái að anda að sér sem mestu af prófunarefninu. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli prófunarklefans. Láta má dýrið verða fyrir váhrifum um munn og nef, á höfuðið eingöngu eða á allan líkamann í einstaklingsklefa, fyrri aðferðirnar tvær hafa þann kost að upptaka prófunarefnisins eftir öðrum leiðum er í lágmarki.

1.6.2.7. *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið skal vera a.m.k. 14 dagar. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og því má lengja tímabilið ef nauðsynlegt er talið. Miklu skiptir hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa og hvenær dýrin drepast, einkum þegar tilhneigingar gætir til síðkomins dauða.

1.6.3. **Verkferli**

Stuttu fyrir prófunina eru dýrin vigtuð og síðan látin verða fyrir váhrifum með prófunarstyrknum í þar til gerðum búnaði í fjórar klukkustundir eftir að styrkurinn í klefanum hefur náð jafnvægi. Jafnvæginu skal náð á skömmum tíma. Hitastiginu við prófunina skal haldið við 22 ± 3 °C. Æskilegt er að rakastiginu sé haldið milli 30–70% en í sumum tilvikum (t.d. við prófanir á sumum úðaefnum) getur það reynst óframkvæmanlegt. Með því að halda vægum undirþrýstingi í klefanum (um 5 mm af vatni) má koma í veg fyrir að prófunarefnið leki út í aðliggjandi svæði. Ekki skal gefa fóður eða vatn meðan á váhrifum stendur. Nota skal kerfi sem henta til að búa til og vakta prófunarloftið. Kerfið á að tryggja að stöðugar váhrifaaðstæður náist svo fljótt sem auðið er. Klefinn skal hannaður og notaður þannig að dreifing prófunarloftsins í klefanum haldist einsleit.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

a) Hraði loftstreymis skal mældur (samfellt).

b) Raunstyrkur prófunarefnisins á öndunarsvæðinu skal mældur a.m.k. þrisvar á váhrifatímanum (sumar loftblöndur, t.d. úðaefni í miklum styrk, kunna að krefjast tíðari vöktunar). Styrkurinn á váhrifatímabilinu má ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu. Við notkun sumra úðaefna getur þó verið ómögulegt að hafa slíka stjórn á styrknum og eru þá leyfð stærri frávik. Agnastærð úðaefna skal greind eins oft og nauðsynlegt er (og a.m.k. einu sinni fyrir hvern prófunarhóp).

c) Hiti og raki skal mældur, samfellt ef þess er kostur.

Á váhrifatímanum og eftir hann eru gerðar athuganir og þær skráðar kerfisbundið og skal halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Gera skal tíðar athuganir fyrsta daginn. Vandleg, klínísk skoðun skal fara fram a.m.k. einu sinni á hverjum vinnudegi og aðrar athuganir skal gera daglega ásamt viðeigandi ráðstöfunum til að lágmarka tap dýra úr rannsókninni, t.d. skal kryfja eða kæla dýr, sem finnast dauð, og einangra eða aflífa veikburða eða dauðvona dýr.

Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að starfsemi öndunarfæra, skjálftum, krömpum, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Dauðastund skal skrá eins nákvæmlega og unnt er. Vigta skal hvert dýr vikulega eftir váhrifatímann og þegar það drepst.

Kryfja skal dýr sem drepast meðan á prófun stendur og þau sem eru lifandi þegar prófuninni lýkur og skal gætt sérstaklega að hvers kyns breytingum í efri og neðri hluta öndunarvegar. Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar. Ef ábendingar eru fyrir því skal taka vefi til vefjameinafræðilegrar rannsóknar.

2. GÖGN

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, dauðastund hvers dýrs, fjöldi dýra sem sýna önnur merki eiturhrifa, lýsing á eiturhrifum og niðurstöður úr krufningu. Breytingar á þyngd verður að reikna út og skrá ef lifun fer yfir einn dag. Ef dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum vegna þjáninga og sársauka sem tengjast prófunarefninu er það skráð sem efnistengd dauðsföll. Ákvarða skal LC_{50} (miðbanastyrk) með viðurkenndri aðferð. Mat á gögnum skal ná til sambandsins, ef það er að finna, milli váhrifanna á dýrin frá prófunarefninu annars vegar og tíðni og umfangs hvers kyns afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. atferlislegs og klínísks afbrigðileika, stórsærra vefjaskemmda, breytinga á líkamsþyngd, dánartíðni og allra annarra eiturhrifa.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður, fóður, o.s.frv.,

— prófunarskilyrði: lýsing á váhrifabúnaði, þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til úðamyndunar, aðferð við loftstýringu og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og styrkleikum úðaefna og dreifingu agnastærðar.

Váhrifagögn

Þessi gögn skulu sett í töflu þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram ef unnt er:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli lofts),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) loftaflfræðilegt massamiðgildisþvermál (MMAD) og rúmfræðilegt staðalfrávik (GSD),

g) tíminn sem það tekur að ná jafnvægi,

h) váhrifatími,

— töflusetning gagna yfir svörun eftir kyni og váhrifastigi (þ.e. fjöldi dýra sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif og fjöldi dýra sem beitt eru váhrifum),

— dauðastund á váhrifatímanum eða eftir hann og ástæður og viðmiðanir fyrir aflífun dýra á mannúðlegan hátt,

— allar athuganir,

— LC_{50}-gildi fyrir hvort kynið, ákvarðað í lok athugunartímabilsins (tilgreina skal reikningsaðferð),

— 95% öryggismörk fyrir LC_{50}-gildi (ef fundin verða),

— ferill, sem sýnir samband skammts og dánarhlutfalls, og halli hans (ef ákvörðunaraðferðin leyfir),

— niðurstöður krufningar,

— allar vefjameinafræðilegar niðurstöður,

— umfjöllun um niðurstöður (einkum skal hugað að áhrifunum sem mannúðleg aflífun dýra á prófunartímanum getur haft á reiknað LC_{50}-gildi),

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta (D-lið).

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta (E-lið).

B.3. **BRÁÐ EITURHRIF (UM HÚÐ)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta (A-lið).

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta (B-lið).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er borið á húð tilraunadýra í nokkrum hópum í stigskiptum skömmtum og er notuð ein skammtastærð fyrir hvern hóp. Því næst eru athuguð þau áhrif sem koma fram, þ.m.t. dauðsföll. Dýr, sem drepast meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

Sýni dýr alvarleg og viðvarandi merki um þjáningu og sársauka getur þurft að aflífa þau á mannúðlegan hátt. Ekki er ætlast til að prófunarefni séu skömmtuð á neinn þann hátt sem vitað er að veldur verulegum sársauka og þjáningu vegna ætandi eða ertandi eiginleika efnisins.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Dýrin eru höfð í tilraunabúrunum við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir tilraunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung, fullvaxin dýr valin af handahófi og skipað í meðferðarhópana. Um það bil 24 klukkustundum fyrir prófun skal feldurinn á hrygg dýranna klipptur eða rakaður af. Þegar feldur er klipptur eða rakaður af skal þess gætt að skaða ekki húðina því að það gæti breytt gegndræpi hennar. Fjarlægja skal feld af a.m.k. 10% af yfirborði skrokksins til að bera prófunarefnið á. Þegar prófuð eru föst efni, sem má dyfta ef við á, skal væta prófunarefnið nægilega með vatni, eða hentugu burðarefni sé þess þörf, til að tryggja góða snertingu við húðina. Ef burðarefni er notað skal taka tillit til áhrifa þess á gegnþrengingu prófunarefnisins um húðina. Fljótandi prófunarefni eru yfirleitt notuð óþynnt.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

1.6.2.1. Tilraunadýr

Nota má fullvaxnar rottur eða kanínur. Nota má aðrar tegundir en færa þarf rök fyrir notkun þeirra. Nota skal algenga rannsóknarstofustofna. Um hvort kynið um sig gildir að við upphaf prófunar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá viðeigandi meðalgildi.

1.6.2.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst fimm dýr fyrir hverja skammtastærð. Þau skulu öll vera af sama kyni. Ef kvendýr eru notuð skulu þau vera eibær og ekki með fangi. Ef fyrir hendi eru upplýsingar um að annað kynið sé miklu næmara en hitt kynið skal nota dýr af fyrrnefnda kyninu.

Athugasemd: ef notuð eru æðri dýr en nagdýr við prófanir á bráðum eiturhrifum skal hugað að því hvort nota megi færri dýr. Skammta skal velja af vandvirkni og leggja allt kapp á að þeir verði ekki stærri en hóflega eitraðir skammtar. Við prófanir af þessu tagi skal varast að gefa banvæna skammta af prófunarefninu.

1.6.2.3. *Skammtastærðir*

Nota skal nægilega margar skammtastærðir, a.m.k. þrjár, og skulu þær valdar þannig að stigvaxandi eiturhrif og dánarhlutföll komi fram í prófunarhópunum. Taka skal tillit til hvers konar ertandi eða ætandi áhrifa þegar skammtastærðir eru ákveðnar. Gögnin skulu vera nægileg til að draga megi upp skammtasvörunarferil og, eftir því sem unnt er, til að ákvarða LC_{50}-gildi með fullnægjandi hætti.

1.6.2.4. *Markprófun*

Framkvæma má markprófun með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar, á hópi fimm karldýra og fimm kvendýra og nota þar verkferlin sem lýst er hér á undan. Ef dýr drepast af völdum efnisins getur verið nauðsynlegt að skoða hvort gera skuli fulla rannsókn.

1.6.2.5. *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið skal vera a.m.k. 14 dagar. Athugunartímabilið skal þó ekki vera svo fastbundið að því megi ekki breyta. Það skal ákveðið með tilliti til eiturverkana, hvenær þær koma fram og hve lengi dýrin eru að ná bata og því má lengja tímabilið ef nauðsynlegt er talið. Miklu skiptir hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa, hversu lengi þau vara og hvenær dýrin drepast, einkum þegar tilhneigingar gætir til síðkomins dauða.

1.6.3. **Verkferli**

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Prófunarefnið skal borið jafnt á svæði sem er u.þ.b. 10% af heildaryfirborði líkamans. Þegar um er að ræða mjög eitruð efni má svæðið, sem borið er á, vera minna en þekja skal eins mikið af svæðinu og unnt er með sem þynnstu og jöfnustu lagi.

Prófunarefninu skal haldið í snertingu við húðina með gisinni grisju og plástri, sem veldur engri ertingu, á váhrifatímabili sem nemur 24 klukkustundum. Að auki skal búið svo um prófunarsvæðið að grisjan og prófunarefnið haldist á sínum stað og dýrin geti ekki innbyrt prófunarefnið. Hefta má dýrin til að koma í veg fyrir að þau innbyrði prófunarefnið en ekki er mælt með því að þeim sé haldið alveg hreyfingarlausum.

Í lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja leifar af prófunarefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hreinsa húðina á annan viðeigandi hátt.

Skrá skal athuganir kerfisbundið jafnóðum og þær eru gerðar. Halda skal sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Gera skal tíðar athuganir fyrsta daginn. Vandleg, klínísk skoðun skal fara fram a.m.k. einu sinni á hverjum vinnudegi og aðrar athuganir skal gera daglega ásamt viðeigandi ráðstöfunum til að lágmarka tap dýra úr rannsókninni, t.d. skal kryfja eða kæla dýr, sem finnast dauð, og einangra eða aflífa veikburða eða dauðvona dýr.

Athuganir skulu ná til breytinga í feldi, meðhöndlaðri húð, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Sérstaklega skal huga að skjálftum, krömpum, munnvatnsrennsli, niðurgangi, sinnuleysi, svefni og dái. Dauðastund verður að skrá eins nákvæmlega og unnt er. Kryfja skal dýr sem drepast meðan á prófun stendur og þau sem eru lifandi þegar prófuninni lýkur. Skrá skal allar stórsæjar, meinafræðilegar breytingar. Ef ábendingar eru fyrir því skal taka vefi til vefjameinafræðilegrar rannsóknar.

Mat á eiturhrifum hjá hinu kyninu

Eftir að rannsókn er lokið á öðru kyninu er a.m.k. einum hópi fimm dýra af hinu kyninu gefinn skammtur af prófunarefninu til að ganga úr skugga um að dýr af því kyni séu ekki miklu næmari fyrir prófunarefninu. Í einstökum tilvikum getur verið réttlætanlegt að nota færri dýr. Ef fyrir hendi eru fullnægjandi upplýsingar til að sýna fram á að kynið, sem prófað var, sé miklu næmara en hitt kynið má sleppa prófun á síðarnefnda kyninu.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, dauðastund hvers dýrs, fjöldi dýra sem sýna önnur merki eiturhrifa, lýsing á eiturhrifum og niðurstöður úr krufningu. Vigta skal hvert dýr og skrá þyngd þess stuttu áður en prófunarefnið er borið á, vikulega eftir það og þegar það drepst og reikna skal út og skrá breytingar á þyngd ef lifun fer yfir einn dag. Ef dýr eru aflífuð af mannúðarástæðum vegna þjáninga og sársauka sem tengjast prófunarefninu er það skráð sem efnistengd dauðsföll. Ákvarða skal LD_{50} með viðurkenndri aðferð.

Mat á gögnum skal ná til mats á sambandinu, ef það er að finna, milli váhrifanna á dýrin frá prófunarefninu annars vegar og tíðni og umfangs hvers kyns afbrigðileika hins vegar, þ.m.t. atferlislegs og klínísks afbrigðileika, stórsærra vefjaskemmda, breytinga á líkamsþyngd, dánartíðni og allra annarra eiturefnafræðilegra áhrifa.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður, fóður, o.s.frv.,

— prófunarskilyrði (m.a. aðferð við hreinsun húðar og tegund umbúða: loftþéttar eða ekki loftþéttar),

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað, og styrkleikar),

— kyn dýranna sem fá skammt,

— töflusetning gagna yfir svörun eftir kyni og skammtastærð (þ.e. fjöldi dýra sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif og fjöldi dýra sem eru látin verða fyrir váhrifum),

— dauðastund eftir að efnið er gefið og ástæður og viðmiðanir fyrir aflífun dýra á mannúðlegan hátt,

— allar athuganir,

— LD_{50}-gildi fyrir kynið sem er látið gangast undir fulla rannsókn, ákvarðað að 14 dögum liðnum og skal tilgreina ákvörðunaraðferðina,

— 95% öryggismörk fyrir LD_{50}-gildið (ef fundin verða),

— ferill, sem sýnir samband skammts og dánarhlutfalls, og halli hans, ef ákvörðunaraðferðin leyfir,

— niðurstöður krufningar,

— allar vefjameinafræðilegar niðurstöður,

— niðurstöður allra prófana á hinu kyninu,

— umfjöllun um niðurstöður (einkum skal hugað að áhrifum sem aflífun dýra á mannúðlegan hátt á prófunartímanum getur haft á reiknað LD_{50}-gildi),

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta (D-lið).

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta (E-lið).

B.4. BRÁÐ EITURHRIF: HÚÐERTING/HÚÐÆTING

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 404 um prófanir (2002)

1.1. INNGANGUR

Við útfærslu þessarar endurbættu aðferðar var sérstaklega hugað að hugsanlegum endurbótum með tilliti til velferðar dýra og að mati á öllum fyrirliggjandi upplýsingum um prófunarefnið til að komast hjá ónauðsynlegum prófunum á tilraunadýrum. Ef þessi aðferð er notuð er mælt með því að fram fari greining á vægi rökstuddra vísbendinga í fyrirliggjandi gögnum, sem málið varða, áður en hafin er prófun í lífi, eins og hér er lýst, á ætandi eða ertandi eiginleikum efnisins. Ef fyrirliggjandi gögn eru ófullnægjandi má auka við þau með raðprófun (1. heimild). Prófunaráætlunin nær yfir fullgiltar og viðurkenndar prófanir í glasi og er birt sem viðbætir við lýsinguna á þessari aðferð. Að auki er mælt með því, þar sem við á, að prófunarplástrarnir þrír í fyrstu prófuninni í lífi séu ekki settir samtímis á dýrið heldur hver á eftir öðrum.

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki framkvæma prófun í lífi fyrr en búið er að meta öll fyrirliggjandi gögn sem varða hugsanleg húðætandi eða húðertandi áhrif efnisins og er það gert með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þessi gögn eru m.a. rökstuddar vísbendingar úr fyrirliggjandi rannsóknum á mönnum og/eða tilraunadýrum, rökstuddar vísbendingar um ætingar- eða ertingareiginleika eins eða fleiri efna með skylda byggingu eða blandna slíkra efna, gögn sem sýna að efnið er mjög súrt eða basískt (2. og 3. heimild) og niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs (4. og 5. heimild og 5. heimild a). Þessi greining ætti að draga úr þörfinni fyrir prófanir í lífi á ætandi eða ertandi áhrifum efna á húð ef þegar liggja fyrir fullnægjandi, rökstuddar vísbendingar úr öðrum rannsóknum viðvíkjandi þessum tveimur endapunktum.

Æskileg raðprófunaráætlun, sem felur í sér fullgiltar og viðurkenndar prófanir í glasi eða utan lífs á ætandi eða ertandi eiginleikum, er birt sem viðbætir við lýsinguna á þessari aðferð. Vinnuhópur Efnahags- og framfarastofnunarinnar (6. heimild) þróaði áætlunina sem fékk meðmæli allra í hópnum og hún hefur verið samþykkt sem ráðlögð prófunaráætlun í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar á íðefnum (HSK) (7. heimild). Mælt er með því að þessari prófunaráætlun sé fylgt áður en prófun í lífi hefst. Þegar um er að ræða ný efni er mælt með þrepskiptri prófunaraðferð við öflun traustra, vísindalegra gagna um ætingar- eða ertingareiginleika efnisins. Ef gögn um húðætandi eða húðertandi áhrif fyrirliggjandi efna eru ófullnægjandi skal nota áætlunina til að fylla í gagnaeyðurnar. Sé notuð önnur prófunaráætlun eða annað prófunarferli eða ákveðið að nota ekki þrepskipta prófunaraðferð ber að rökstyðja það.

Ef ekki er hægt að ákvarða ætingar- eða ertingareiginleika með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga í samræmi við raðprófunaráætlunina kemur til greina að nota prófun í lífi (sjá viðbætinn).

1.2. SKILGREININGAR

Húðerting: skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir og getur gengið til baka.

Húðæting: varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar, hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Efnið, sem prófa á, er borið í einum skammti á húð tilraunadýrs og eru ómeðhöndluð svæði á húð dýrsins notuð til samanburðar. Umfang ertingar eða ætingar er ákvarðað og gefið stig eftir ákveðnum kvarða og lýst frekar til að unnt sé að meta áhrifin til fulls. Rannsóknin þarf að ná yfir nógu langan tíma til að unnt sé að meta hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka eða séu varanleg.

Dýr, sem sýna viðvarandi merki um mikla þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og efnið metið í samræmi við þetta. Í 8. riti í heimildaskrá eru tilgreindar viðmiðanir fyrir ákvörðun um mannúðlega aflífun dauðvona og sárþjáðra dýra.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur fyrir prófun í lífi**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Kanínuhvítingjar eru ákjósanlegustu tilraunadýrin og skal nota heilbrigð, ung, fullvaxin dýr. Ef notuð er önnur dýrategund skal það rökstutt.

1.4.1.2. *Undirbúningur dýra*

Um það bil 24 klukkustundum fyrir prófun skal feldurinn á hrygg dýranna snöggklipptur. Gæta skal þess að skaða ekki húðina og skal einungis nota dýr með heilbrigða og óskaddaða húð.

Á sumum kanínustofnum er feldurinn þéttastur á afmörkuðum blettum sem eru mest áberandi á ákveðnum tímum árs. Ekki skal nota þessa bletti við prófun.

1.4.1.3. *Aðbúnaður og fóðrun*

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 (± 3) ºC fyrir kanínur. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

1.4.2. **Prófunarferli**

1.4.2.1. *Prófunarefnið borið á*

Prófunarefnið skal borið á lítið húðsvæði (u.þ.b. 6 cm^2) og hulið með grisju sem haldið er fastri með plástri sem veldur engri ertingu. Ef ekki er unnt að bera efnið beint á (t.d. ef prófunarefnið er fljótandi eða maukkennt) skal setja prófunarefnið á grisjuna og leggja hana síðan á húðina. Grisjunni skal haldið í lauslegri snertingu við húðina með hentugum, hálfloftþéttum umbúðum allan váhrifatímann. Ef prófunarefnið er sett á grisjuna skal festa hana við húðina þannig að efnið sé í náinni snertingu við húðina og dreifist jafnt á hana. Koma skal í veg fyrir að dýrið nái til grisjunnar og innbyrði prófunarefnið eða andi því að sér.

Fljótandi prófunarefni eru yfirleitt notuð óþynnt. Ef prófuð eru föst efni (sem má dyfta ef það er talið nauðsynlegt) er prófunarefnið vætt með minnsta magni af vatni (eða öðru heppilegu burðarefni ef þess er þörf) sem nægir til að tryggja góða snertingu við húðina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn mega þau aðeins hafa lágmarksáhrif á húðertingarmátt prófunarefnisins.

Í lok váhrifatímabilsins, sem er venjulega fjórar klukkustundir, skal fjarlægja leifar af prófunarefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hentugu leysiefni og varast að breyta framkallaðri svörun eða skaða húðþekjuna.

1.4.2.2. *Skammtastærð*

Borinn er skammtur, sem nemur 0,5 ml af vökva eða 0,5 g af föstu eða maukkenndu efni, á prófunarstaðinn.

1.4.2.3. *Upphafsprófun (húðertingar-/húðætingarprófun í lífi á einu dýri)*

Eindregið er mælt með því að prófun í lífi sé í upphafi aðeins gerð með einu dýri, einkum ef grunur leikur á um að efnið hafi ætingarmátt. Þetta er í samræmi við raðprófunaráætlunina (sjá 1. viðbæti).

Hafi efni verið dæmt ætandi á grundvelli greiningar á vægi rökstuddra vísbendinga er ekki þörf á frekari prófunum á dýrum. Fyrir flest efni, sem grunur leikur á að séu ætandi, er yfirleitt ekki þörf á frekari prófun í lífi. Í þeim tilvikum, þar sem talin er nauðsyn á frekari gögnum vegna ófullnægjandi niðurstaðna, má þó framkvæma takmarkaðar prófanir á dýrum með eftirfarandi aðferð: settar eru allt að þrjár prófunargrisjur,

hver á eftir annarri, á dýrið. Fyrsta grisjan er fjarlægð eftir þrjár mínútur. Verði ekki vart ákafrar svörunar í húðinni er önnur grisja sett á og fjarlægð að klukkustund liðinni. Ef athuganir á þessu stigi benda til þess að mannúðarsjónarmið leyfi að váhrifatíminn sé allt að fjórar klukkustundir skal þriðja grisjan sett á og fjarlægð að fjórum klukkustundum liðnum og svörunin flokkuð.

Ef ætandi áhrifa verður vart eftir einhverja þessara þriggja grisja, sem settar voru á hver á eftir annarri, skal prófun hætt tafarlaust. Verði ekki vart ætandi áhrifa þegar síðasta grisjan er fjarlægð er fylgst með dýrinu í 14 daga nema æting komi fram fyrr.

Ef talið er að prófunarefnið hafi ekki ætandi áhrif en kunni að vera ertandi skal hafa eina grisju á einu dýri í fjórar klukkustundir.

1.4.2.4. *Staðfestingarprófun (húðertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)*

Verði ekki vart ætandi áhrifa í upphafsprófuninni skal staðfesta ertingarsvörun eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum til viðbótar og skal ein grisja sett á hvort dýr og váhrifatímabilið vera fjórar klukkustundir. Verði vart ertingaráhrifa í upphafsprófuninni má gera staðfestingarprófun með raðbundinni aðferð eða með því að láta tvö dýr til viðbótar verða samtímis fyrir váhrifum. Í því undantekningartilviki að ekki sé framkvæmd upphafsprófun má meðhöndla tvö eða þrjú dýr með einni grisju á hvert dýr sem er svo fjarlægð eftir fjórar klukkustundir. Ef tvö dýr eru notuð og bæði sýna sömu svörun er frekari prófunar ekki þörf. Að öðrum kosti er þriðja dýrið prófað. Nauðsynlegt getur reynst að nota fleiri dýr ef svörunin er tvíræð.

1.4.2.5. *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið þarf að vera nógu langt til að unnt sé að meta til fulls hvort áhrifin, sem vart verður, geti gengið til baka. Tilrauninni skal þó hætt um leið og dýrið sýnir viðvarandi merki um mikinn sársauka eða þjáningu. Fylgst skal með dýrunum í allt að 14 daga eftir að grisjurnar hafa verið fjarlægðar til að ákvarða hvort áhrifin ganga til baka. Komi í ljós, áður en liðnir eru 14 dagar, að áhrifin ganga til baka skal tilrauninni strax hætt.

1.4.2.6. *Klínískar athuganir og flokkun húðviðbragða*

Dýrin skulu skoðuð með tilliti til merkja um hörundsroða og bjúg og gefin stig fyrir svörun eftir 60 mínútur og síðan 24, 48 og 72 klukkustundum eftir að grisjan hefur verið fjarlægð. Við upphafsprófun á einu dýri er prófunarstaðurinn einnig skoðaður um leið og grisjan hefur verið fjarlægð. Húðviðbrögð eru flokkuð og skráð samkvæmt stigagjöfinni í töflunni hér á eftir. Ef húðin hefur orðið fyrir skaða sem hvorki er hægt að flokka sem ertingu eða ætingu eftir 72 klukkustundir kann að vera nauðsynlegt að halda athugun áfram fram að 14. degi til að ákvarða hvort áhrifin ganga til baka. Til viðbótar við athugun á ertingu skal lýsa til fulls og skrá öll staðbundin eiturhrif, s.s. að húðfitan minnki, og öll altæk, skaðleg áhrif (t.d. klínísk merki um eiturhrif og áhrif á líkamsþyngd). Til greina kemur að gera vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.

Flokkun húðsvörunar er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á flokkun húðsvörunar, og til að aðstoða prófunarstofur og aðra hlutaðeigandi aðila við athuganir sínar og túlkun niðurstaðna úr þeim, þarf að kenna starfsfólkinu, sem vinnur við þessar athuganir, nægilega vel á stigakerfið sem er notað (sjá töfluna hér á eftir). Myndskreyttur leiðarvísir um flokkun húðertingar og annarra vefjaskemmda gæti komið að góðum notum (9. heimild)

2. **GÖGN**

2.1. FRAMSETNING NIÐURSTAÐNA

Rannsóknarniðurstöðurnar skulu teknar saman í töflu í lokaskýrslu prófunar og skal þar getið allra atriða sem talin eru upp í lið 3.1.

2.2. MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal húðertinguna til stiga í tengslum við eðli og alvarleika vefjaskemmda og hvort skemmdirnar geti gengið til baka eða ekki. Stigafjöldinn í hverju einstöku tilviki er ekki algild viðmiðun fyrir erting-areiginleika prófunarefnis þar eð önnur áhrif efnisins eru einnig metin. Í stað þess ber að líta á stigagjöfina í hverju einstöku tilviki sem viðmiðunargildi sem þarf að meta í samhengi við allar aðrar athuganir sem gerðar voru í rannsókninni.

Við mat á ertingarsvörun skal líta til þess hvort vefjaskemmdir í húð geti gengið til baka. Ef svörunar á borð við hármissi (á takmörkuðu svæði), siggmein, vefjaauka og hrúðurmyndun gætir enn í lok 14 daga athugunartímabilsins ber að líta á prófunarefnið sem ertandi.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Rökstuðningur fyrir prófun í lífi: greining á vægi rökstuddra vísbendinga í gögnum sem lágu fyrir áður en prófun hófst, þ.m.t. niðurstöður úr raðprófunaráætlun:

— lýsing á viðeigandi gögnum sem liggja fyrir úr fyrri prófunum,

— gögn úr einstökum áföngum prófunaráætlunarinnar,

— lýsing á þeim prófunum í glasi sem fram fóru, þ.m.t. ítarleg lýsing á þeim verkferlum, sem voru notuð, og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunarefnum,

— greiningin á vægi rökstuddra vísbendinga sem lá til grundvallar rannsókninni í lífi.

Prófunarefni:

— auðkennisgögn (t.d. CAS-númer, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi og lotunúmer),

— eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni, leysni og stöðugleiki),

— ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutföll efnisþátta (í %).

Burðarefni:

— auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,

— rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð og ef notuð eru önnur dýr en kanínuhvítingjar skal það rökstutt,

— fjöldi dýra af hvoru kyni,

— þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar,

— aldur í upphafi rannsóknar,

— uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

Prófunarskilyrði:

— aðferð við undirbúning svæðis fyrir grisjuplástra,

— upplýsingar um grisjuefnin og aðferð við plástrun,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins og hvernig það er borið á og fjarlægt.

Niðurstöður:

— töflusetning stigagjafar fyrir ertingar- eða ætingarsvörun fyrir hvert dýr á hverjum athugunartíma,

— lýsing á öllum vefjaskemmdum sem komu fram,

— lýsing í samfelldu máli á eðli og umfangi þeirrar ertingar eða ætingar, sem kom fram, og vefjameinafræðilegar niðurstöður,

— lýsing á öðrum skaðlegum, staðbundnum áhrifum (s.s. minnkun húðfitu) og altækum áhrifum til viðbótar við húðertingu eða húðætingu.

— Umfjöllun um niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, bls. 410-429.

2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicollogy In Vitro, 2, bls. 19-26.

3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, bls. 709-720.

4) ECETOC (1990) Monograph No 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, bls. 483-524.

(5a) Testing Method B.40 Skin Corrosion.

6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm).

7) OECD (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm).

8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm).

9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

(Fæst hjá skrifstofu Efnahags- og framfarastofnunarinnar).

TAFLA I

FLOKKUN HÚÐVIÐBRAGÐA

Hörundsroði og brunaskorpumyndun

Enginn hörundsroði	0
Örlítill hörundsroði (vart sjáanlegur)	1
Greinilegur hörundsroði	2
Hörundsroði í meðallagi eða mikill	3
Mikill hörundsroði (purpuraroði) allt að brunaskorpumyndun sem hindrar flokkun hörundsroða	4

Hámarksgildi: 4.

Bjúgmyndun

Enginn bjúgur	0
Örlítill bjúgur (vart sjáanlegur)	1
Lítill bjúgur (vel afmarkað svæði með greinilegri lyftingu)	2
Bjúgur í meðallagi (lyfting nemur u.þ.b. 1 mm)	3
Mikill bjúgur (lyfting er yfir 1 mm og nær út fyrir váhrifasvæðið)	4

Hámarksgildi: 4.

Gera má vefjameinafræðilega rannsókn til að skera úr um tvíræða svörun.

Viðbætir

Raðprófunaráætlun fyrir húðertingu og húðætingu

ALMENN ATRIÐI

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra er mikilvægt að nota ekki tilraunadýr að nauðsynjalausu og lágmarka prófanir sem líklegt er að kalli fram mikla svörun hjá dýrum. Allar upplýsingar um efni, sem varða hugsanlega húðætingar- eða húðertingareiginleika þess, skulu metnar áður en hugað er að prófun í lífi. Hugsanlegt er að þegar liggi fyrir nægilegar upplýsingar til að flokka viðkomandi prófunarefni með tilliti til húðætingar- eða húðertingarmáttar þess án þess að gera þurfi prófanir á tilraunadýrum. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga og notkun raðprófunaráætlunar lágmarka því þörfina á prófun í lífi, einkum ef efnið er líklegt til að kalla fram mikla svörun.

Mælt er með því að notuð sé greining á vægi rökstuddra vísbendinga til að meta fyrirliggjandi upplýsingar um húðertingar- og húðætingarmátt efna í því skyni að ákvarða hvort rétt sé að gera frekari rannsóknir, aðrar en húðrannsóknir í lífi, sem hjálpað geta við lýsingu á þeim mætti. Sé þörf á frekari rannsóknum er mælt með því að notuð sé raðprófunaráætlun til að afla viðeigandi tilraunagagna. Þegar um er að ræða efni sem hafa ekki verið prófuð áður skal nota raðprófunaráætlun við öflun þeirra gagna sem þarf til að meta húðætingar- eða húðertingarmátt efnanna. Prófunaráætlunin, sem lýst er í þessum viðbæti, var samin á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (1. heimild) og síðar staðfest og aukin fyrir samræmda og samþætta kerfið til hættuflokkunar á áhrifum efna á heilbrigði manna og umhverfið sem var samþykkt á 28. sameiginlega fundi íðefnanefndar og íðefnavinnuhóps stofnunarinnar í nóvember 1998 (2. heimild).

Þótt þessi raðprófunaráætlun sé ekki órofa hluti af prófunaraðferð B.4 er hún sú áætlun sem mælt er með til að ákvarða húðertingar- eða húðætingareiginleika. Áætlunin felur bæði í sér bestu starfsvenjur og siðareglur fyrir prófun í lífi á húðertingu eða húðætingu. Í lýsingu á prófunaraðferðinni eru gefnar leiðbeiningar um framkvæmd prófana í lífi og tilgreind í stuttu máli þau atriði sem þarf að afgreiða áður en hafist er handa við slíka prófun. Í áætluninni er aðferð til að meta fyrirliggjandi gögn um húðertingar- eða húðætingareiginleika prófunarefna og stigskipt aðferð til að afla viðeigandi gagna um efni sem útheimta frekari rannsóknir eða sem engar rannsóknir hafa verið gerðar á. Einnig er mælt með því að við tilteknar aðstæður séu gerðar fullgiltar og viðurkenndar prófanir í lífi eða utan lífs á húðætingu eða húðertingu.

LÝSING Á MATS- OG PRÓFUNARÁÆTLUN

Áður en gerðar eru prófanir, sem eru hluti af raðprófunaráætlun (sjá mynd), skal meta allar fyrirliggjandi upplýsingar til að ákvarða þörfina á húðprófun í lífi. Vera kann að afla megi mikilvægra upplýsinga með mati á einstökum áhrifaþáttum (t.d. mjög háu eða mjög lágu sýrustigi) en þó ber að skoða allar fyrirliggjandi upplýsingar í heild sinni. Öll viðeigandi gögn um áhrif efnisins, sem um er að ræða, eða áhrif hliðstæðra efna skulu metin þegar tekin er ákvörðun á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga og skal rökstyðja ákvörðunina. Leggja skal megináherslu á fyrirliggjandi gögn um áhrif efnisins á menn og dýr og því næst á útkomuna úr prófun í glasi og utan lífs. Reynt skal eftir megni að komast hjá rannsóknum í lífi á ætandi efnum. Eftirfarandi atriði skulu m.a. tekin til greina í prófunaráætluninni:

Mat á fyrirliggjandi gögnum um menn og dýr (1. þrep). Fyrst skal skoða fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn, t.d. úr klínískum rannsóknum eða rannsóknum á starfsumhverfi, og tilfellaskýrslur (e. *case reports*) og/eða gögn úr prófunum á dýrum, t.d. úr rannsóknum á eiturhrifum þar sem beitt er váhrifum á húð í eitt skipti eða endurtekið, þar eð þessi gögn veita beinar upplýsingar um áhrif á húðina. Ekki þarf að rannsaka efni í lífi ef um er að ræða efni með þekkta ertingar- eða ætingareiginleika og efni sem ljóst er að eru óætandi og óertandi.

Greining á venslum efnabyggingar og virkni (2. þrep). Skoða skal niðurstöður úr prófunum á efnum með skylda byggingu ef þær eru fyrir hendi. Ef fyrir liggja gögn um áhrif á menn og/eða dýr frá efnum með skylda byggingu eða blöndum slíkra efna og gögnin nægja til að sýna húðætingar- eða húðertingarmátt þeirra má ganga út frá því að prófunarefnið, sem verið er að meta, framkalli sömu svörun. Þegar svo er þarf e.t.v. ekki að prófa prófunarefnið. Neikvæð gögn úr rannsóknum á efnum með skylda efnabyggingu eða blöndum slíkra efna eru ekki næg sönnun, samkvæmt raðprófunaráætluninni, fyrir því að tiltekið efni sé óætandi eða óertandi. Nota skal fullgiltar og viðurkenndar aðferðir til að sanngreina bæði húðætingar- og húðertingarmátt.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar og hvarfgirni (3. þrep). Efni með mjög hátt eða mjög lágt sýrustig, t.d. $\leq 2{,}0$ og $\geq 11{,}5$, geta haft mikil staðbundin áhrif. Ef mjög hátt eða mjög lágt sýrustig er notað til að staðfesta að efni er húðætandi er eðlilegt að skoða einnig sýru- eða basaforða (eða jafnarýmd (e. *buffering capacity*)) efnisins (3. og 4. heimild). Ef jafnarýmdin gefur til kynna að efnið sé ekki húðætandi skal gera frekari prófanir til að staðfesta þetta og helst skal nota fullgilta og viðurkennda prófun í glasi eða utan lífs (sjá 5. og 6. þrep).

Eiturhrif á húð (4. þrep). Ef sannað hefur verið að tiltekið íðefni sé mjög eitrað við íkomuleið um húð getur reynst ógerlegt að framkvæma rannsókn í lífi á húðertingu eða húðætingu þar eð það magn prófunarefnis, sem er venjulega borið á, kann að vera meira en sá skammtur sem telst mjög eitraður og þar af leiðandi valda því að dýrin drepast eða líða miklar þjáningar. Hafi áður verður gerð rannsókn með kanínuhvítingjum á eiturhrifum á húð upp að háskammtinum 2000 mg/kg miðað við líkamsþyngd eða stærri skammti og engin húðerting eða húðæting komið í ljós er auk þess e.t.v. ónauðsynlegt að gera frekari prófanir á húðertingu eða húðætingu. Við mat á niðurstöðum úr fyrri rannsóknum á bráðum eiturhrifum á húð þarf að huga að ýmsum atriðum. Upplýsingar um vefjaskemmdir geta t.d. verið ófullnægjandi. Ef til vill voru prófanirnar og athuganirnar gerðar á annarri dýrategund en kanínum en næmi í svörun getur verið mjög mismunandi eftir dýrategundum. Einnig getur verið að prófunarefnið, sem var borið á dýrin, hafi ekki verið í heppilegu formi fyrir mat á húðertingu eða húðætingu (t.d. þynning efnisins við prófun á eiturhrifum á húð (5. heimild)). Í þeim tilvikum þar sem gerðar hafa verið vel hannaðar og vel unnar rannsóknir með kanínum á eiturhrifum á húð má þó telja neikvæðar niðurstöður nægilega sönnun fyrir því að efnið sé óætandi eða óertandi.

Niðurstöður úr prófunum í glasi eða utan lífs (5. og 6. þrep). Ekki þarf að prófa efni á dýrum ef sýnt hefur verið fram á í fullgiltri og viðurkenndri prófun í lífi eða utan lífs (6. og 7. heimild), sem var sérstaklega hönnuð til að meta þessi sérstöku áhrif, að þau hafi ætandi eða mjög ertandi eiginleika. Ganga má út frá því að slík efni hafi svipuð áhrif í lífi.

Prófun í lífi á kanínum (7. og 8. þrep). Ef tekin er sú ákvörðun, á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga, að framkvæma prófun í lífi skal byrja á upphafsprófun þar sem notað er eitt dýr. Ef niðurstöður úr þessari prófun sýna að efnið er húðætandi skal ekki gera frekari prófanir. Verði ekki vart ætandi áhrifa í upphafsprófuninni skal staðfesta ertingarsvörun eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum til viðbótar þar sem váhrifatíminn er fjórar klukkustundir. Verði ertingaráhrifa vart í upphafsprófuninni má gera staðfestingarprófun með raðbundinni aðferð eða með því að láta tvö dýr til viðbótar verða samtímis fyrir váhrifum.

HEIMILDIR

1) OECD, (1996) Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M., (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, bls. 709-720.

4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H., (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxicology In Vitro, 2(1), bls. 19-26.

5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, bls. 411-436.

6) Prófunaraðferð B.40.

7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, bls. 483-524.

Mynd

PRÓFUNAR- OG MATSÁÆTLUN FYRIR HÚÐERTINGU/HÚÐÆTINGU

	Virkni	Niðurstaða	Niðurstaða
1.	Fyrirliggjandi gögn um menn og/eða dýr sýna áhrif á húð eða slímhúð	Ætandi	Endapunktur: talið ætandi. Ekki er þörf á prófun.
		Ertandi	Endapunktur: talið ertandi. Ekki er þörf á prófun.
		Ekki ætandi/ekki ertandi	Endapunktur: ekki talið ætandi eða ertandi. Ekki er krafist prófunar.
	↓ *Upplýsingar ekki fyrirliggjandi eða ekki afdráttarlausar* ↓		
2.	Framkvæma skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni með tilliti til húðætingar eða –ertingar	Vænta má alvarlegra húðskemmda	Talið ætandi. Ekki er þörf á prófun.
		Vænta má húðertingar	Talið ertandi. Ekki er þörf á prófun.
	↓ *Ekki er hægt að setja fram spár eða spár eru óljósar eða neikvæðar* ↓		
3.	Sýrustig skal mælt (skoða skal jafnarýmd ef við á)	pH ≤ 2 eða ≥ 11,5 (með mikilli jafnarýmd, ef við á)	Gera skal ráð fyrir ætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	↓ *2 < pH < 11,5 eða pH ≤ 2,0 eða ≥ 11,5 með lítilli eða engri jafnarýmd, ef við á* ↓		
4.	Meta skal gögn um altæk eiturhrif við íkomuleið um húð (1)	Mjög eitrað	Ekki er þörf á frekari prófun.
		Hvorki ætandi né ertandi við prófun með kanínum upp að eða upp fyrir háskammtinn 2000 mg/kg líkamsþyngdar	Gera skal ráð fyrir að efnið sé hvorki ætandi né ertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓ *Þessar upplýsingar eru ekki fyrirliggjandi eða ekki afdráttarlausar* ↓		
5.	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda húðætingarprófun í glasi eða utan lífs	Ætandi svörun	Gera skal ráð fyrir ætingareiginleikum í lífi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓ *Efnið er ekki ætandi* ↓		
6.	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda húðertingarprófun í glasi eða utan lífs	Ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir ertingareiginleikum í lífi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓ *Fullgiltar aðferðir til prófunar í glasi eða utan lífs á húðertingu liggja ekki fyrir enn sem komið er eða efnið er ekki ertandi* ↓		
7.	Framkvæma skal upphafsprófun í lífi með kanínu og skal aðeins nota eitt dýr	Alvarlegar húðskemmdir	Talið ætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓ *Engar alvarlegar skemmdir* ↓		
8.	Framkvæma skal staðfestingarprófun með einu eða tveimur dýrum til viðbótar	Ertandi eða ætandi	Talið ætandi eða ertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
		Hvorki ætandi né ertandi	Hvorki talið ætandi né ertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.

(1) Má íhuga á undan 2. og 3. þrepi.

B.5. BRÁÐ EITURHRIF: AUGNERTING/AUGNÆTING

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 405 um prófanir (2002)

1.1. INNGANGUR

Við útfærslu þessarar endurbættu aðferðar var sérstaklega hugað að því hvort unnt væri að bæta hana með því að meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið til að komast hjá ónauðsynlegum prófunum á tilraunadýrum og taka þannig tillit til velferðar dýra. Ef þessi aðferð er notuð er mælt með því að fram fari greining á vægi rökstuddra vísbendinga í fyrirliggjandi gögnum sem málið varða áður en hafin er prófun í lífi, eins og hér er lýst, á bráðri augnertingu eða augnætingu (1. heimild). Ef fyrirliggjandi gögn eru ófullnægjandi er mælt með því að aukið sé við þau með raðprófun (2. og 3. heimild). Prófunaráætlunin nær yfir prófanir á fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi og er birt sem viðbætir við lýsinguna á prófunaraðferðinni. Að auki er mælt með því að gerð sé prófun í lífi á húðertingu/húðætingu til að spá fyrir um augnætingu áður en hugað er að augnprófun í lífi.

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra skal ekki huga að prófun í lífi fyrr en búið er að meta öll fyrirliggjandi gögn sem varða hugsanleg ætandi eða ertandi áhrif efnisins á augu og er það gert með greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga. Þessi gögn eru m.a. rökstuddar vísbendingar úr fyrirliggjandi rannsóknum á mönnum og/eða tilraunadýrum, rökstuddar vísbendingar um ætingar- eða ertingareiginleika eins eða fleiri efna með skylda byggingu eða blandna slíkra efna, gögn sem sýna að efnið er mjög súrt eða mjög basískt (4. og 5. heimild) og niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs á húðætingu og húðertingu (6. heimild og heimild 6a). Rannsóknirnar kunna að hafa farið fram á undan greiningu á vægi rökstuddra vísbendinga eða verið afleiðing slíkrar greiningar.

Að því er viðvíkur sumum efnum getur slík greining sýnt að þörf er á rannsóknum í lífi á augnætingar- eða augnertingarmætti efnisins. Í öllum slíkum tilvikum skal helst framkvæma rannsókn í lífi á áhrifum efnisins á húð og meta þessi áhrif í samræmi við prófunaraðferð B.4 (7. heimild) áður en til greina kemur að gera augnprófun í lífi. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga og raðprófunaráætlunin ættu að draga úr þörfinni á prófun í lífi á ætandi eða ertandi áhrifum efna á augu ef þegar liggja fyrir fullnægjandi, rökstuddar vísbendingar úr öðrum rannsóknum að því er varðar þessa eiginleika. Ef ekki er unnt að ákvarða augnætingar- eða augnertingarmátt með raðprófunaráætlun, jafnvel þótt gerð hafi verið rannsókn í lífi á húðætingu og húðertingu, er hægt að gera augnætingar- eða augnertingarprófun í lífi.

Æskileg raðprófunaráætlun, sem felur í sér fullgiltar prófanir í glasi eða utan lífs á ætandi/ertandi eiginleikum, er birt í viðbætinum við lýsinguna á þessari prófunaraðferð. Vinnuhópur Efnahags- og framfarastofnunarinnar (8. heimild) þróaði áætlunina sem fékk meðmæli allra í hópnum og hún hefur verið samþykkt sem ráðlögð prófunaráætlun í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar á íðefnum (HSK) (9. heimild). Mælt er með því að þessari prófunaráætlun sé fylgt áður en prófun í lífi hefst. Þegar um er að ræða ný efni er mælt með þrepskiptri prófunaraðferð við öflun traustra, vísindalegra gagna um ætingar- eða ertingareiginleika efnisins. Ef gögn um húðætandi eða húðertandi áhrif fyrirliggjandi efna eru ófullnægjandi skal nota áætlunina til að fylla í gagnaeyðurnar. Ef vikið er frá prófunaráætlun eða -aðferð eða ef ákveðið er að nota ekki þrepskipta prófunaraðferð ber að rökstyðja það.

1.2. SKILGREININGAR

Augnerting: breytingar í auga, eftir að prófunarefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á.

Augnæting: vefjaskemmdir í auga eða alvarleg sjónskerðing, eftir að prófunarefni hefur verið borið á framflöt augans, sem ganga ekki algerlega til baka innan 21 dags frá því að efnið var borið á.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er borið í einum skammti í annað auga tilraunadýrsins en ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar. Umfang augnertingar og augnætingar er metið með því að gefa stig eftir ákveðnum kvarða fyrir skemmdir í slímhúð, glæru (hornhimnu) og lithimnu augans. Öðrum áhrifum á augu og skaðlegum, altækum áhrifum er einnig lýst til að gefa heildarmynd af áhrifunum. Rannsóknin þarf að ná yfir nógu langan tíma til að unnt sé að meta hvort áhrifin geti gengið til baka eða séu varanleg.

Dýr, sem sýna viðvarandi merki um mikla þjáningu og/eða sársauka á einhverju stigi prófunarinnar, skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og efnið metið í samræmi við þetta. Í 10. riti í heimildaskrá eru tilgreindar viðmiðanir fyrir ákvörðun um mannúðlega aflífun dauðvona og sárþjáðra dýra.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur fyrir prófun í lífi**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Kanínuhvítingjar eru ákjósanlegustu tilraunadýrin og skal nota heilbrigð, ung, fullvaxin dýr. Ef notaðir eru aðrir stofnar eða önnur dýrategund skal það rökstutt.

1.4.1.2. *Dýrin undirbúin*

Innan 24 klukkustunda fyrir prófun skal skoða bæði augu allra tilraunadýra sem hafa til bráðabirgða verið valin til prófunar. Ekki skal nota dýr sem þjást af augnertingu eða augngalla eða hafa skemmda glæru fyrir.

1.4.1.3. *Aðbúnaður og fóðrun*

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 20 (± 3) ºC fyrir kanínur. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

1.4.2. **Prófunarferli**

1.4.2.1. *Prófunarefninu dreypt í auga*

Prófunarefnið er sett í slímhúðarpoka annars augans á hverju dýri eftir að neðra augnlokið hefur verið togað varlega frá auganu. Augnlokunum er síðan haldið varlega saman í u.þ.b. eina sekúndu til þess að koma í veg fyrir að efnið renni út. Ómeðhöndlaða augað er notað til samanburðar.

1.4.2.2. *Skolun*

Ekki má skola augu tilraunadýranna í a.m.k. 24 klukkustundir eftir ídreypingu með prófunarefninu nema um sé að ræða föst efni (sjá lið 1.4.2.3.2) eða ef ætandi eða ertandi áhrif koma strax fram. Eftir 24 klukkustundir má skola augun ef ástæða þykir til.

Ekki er mælt með því að notaður sé fylgihópur dýra til að rannsaka áhrif skolunar nema það sé stutt vísindalegum rökum. Ef þörf er á fylgihópi skal nota tvær kanínur. Skilyrðin við skolun skulu skjalfest af nákvæmni, þ.e. tími skolunar, samsetning og hitastig skolvökvans, hversu lengi skolun varir og rúmmál og hraði ídreypingar.

1.4.2.3. *Skammtastærð*

1.4.2.3.1. *Prófun vökva*

Við prófun á vökvum er notaður 0,1 ml skammtur. Ekki skal nota úðadælur til að setja efnið beint í augað. Þess í stað skal sprauta úðanum og láta vökvann safnast fyrir í öðru íláti og dreypa því næst 0,1 ml af honum í augað.

1.4.2.3.2. *Prófun fastra efna*

Við prófun á föstum efnum, maukkenndu efni og efnisögnum skal sýnið vera 0,1 ml að rúmmáli eða í mesta lagi 100 mg að þyngd. Prófunarefnið skal mulið í fíngert duft. Rúmmál fastra efna skal mælt eftir að þeim hefur verið þjappað varlega saman, t.d. með því að slá laust á mæliílátið. Ef fasta efnið hefur ekki horfið úr auga prófunardýrsins á eðlilegan hátt þegar kemur að fyrsta athugunartíma, einni klukkustund eftir meðhöndlun, má hreinsa augað með saltvatni eða eimuðu vatni.

1.4.2.3.3. *Prófun úðaefna*

Mælt er með því að öllum úðadæluvökva og úðaefnum sé safnað í annað ílát áður en þeim er dreypt í augað. Eina undantekningin frá þessu eru efni í þrýstiúðabrúsum en ekki er hægt að safna þeim í annað ílát vegna uppgufunar. Í því tilviki skal halda auganu opnu og úða prófunarefninu í augað í einni lotu, sem varir í u.þ.b. eina sekúndu, og úr 10 cm fjarlægð beint fyrir framan augað. Fjarlægðin getur verið breytileg eftir þrýstingnum í úðabrúsanum og innihaldi hans. Þess skal gætt að úðaþrýstingurinn skaði ekki augað. Í tilteknum tilvikum þarf e.t.v. að meta möguleikann á „aflrænum“ skaða á auganu vegna þess hve kröftug úðunin er.

Meta má skammtinn úr úðabrúsanum með því að líkja eftir prófuninni á eftirfarandi hátt:

efninu er úðað á vigtunarblað gegnum op sem sett er beint fyrir framan blaðið og er á stærð við kanínuauga. Þyngdaraukning blaðsins er notuð til að finna u.þ.b. það magn sem er úðað í augað. Ef efnin eru rokgjörn má áætla skammtinn með því að vigta viðtökuílátið áður en og eftir að prófunarefnið er tekið úr því.

1.4.2.4. *Upphafsprófun* (augnertingar- eða augnætingarprófun í lífi á einu dýri)

Eins og fram kom í raðprófunaráætluninni (sjá 1. viðbæti) er eindregið mælt með því að gerð sé prófun í lífi í upphafi á einu dýri.

Ef niðurstöðurnar úr þessari prófun sýna að efnið er ætandi eða mjög ertandi fyrir augað, þegar fylgt er verkferlinu sem lýst var, skal ekki gera frekari augnertingarprófanir.

1.4.2.5. *Staðdeyfilyf*

Heimilt er að nota staðdeyfilyf og skal tekin ákvörðun um það í hverju tilviki fyrir sig. Sýni greining á vægi rökstuddra vísbendinga að efnið getur valdið sársauka eða sýni dýrið sársaukaviðbrögð í upphafsprófun má beita staðdeyfingu áður en efnið er sett í augað. Ákveða skal tegund, styrk og skammt staðdeyfilyfs af vandvirkni til að tryggja að það hafi ekki áhrif á svörunina við prófunarefninu. Samanburðaraugað skal staðdeyft á samsvarandi hátt.

1.4.2.6. *Staðfestingarprófun (augnertingarprófun í lífi á fleiri dýrum til viðbótar)*

Komi ekki fram ætingarverkun í upphafsprófuninni skal staðfesta ertandi eða neikvæða svörun með allt að tveimur dýrum. Komi fram mjög ertandi áhrif í upphafsprófun, sem benda til þess að vænta megi ákafra (óafturkallanlegra) áhrifa í staðfestingarprófuninni, er mælt með því að staðfestingarprófunin sé raðprófun með einu dýri í einu fremur en að prófa tvö dýr í einu til viðbótar. Ef ætandi eða mjög ertandi verkun kemur fram hjá seinna dýrinu er prófuninni ekki haldið áfram. Til að staðfesta ertandi svörun sem er veik eða í meðallagi þarf ef til vill að nota fleiri dýr til viðbótar.

1.4.2.7. *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið þarf að vera nógu langt til að unnt sé að meta til fulls umfang þeirra áhrifa, sem vart verður, og hvort þau geti gengið til baka. Tilrauninni skal þó hætt um leið og dýrið sýnir viðvarandi merki um mikinn sársauka eða þjáningu (9. heimild). Venjulega skal fylgst með dýrinu í 21 dag eftir meðhöndlun með prófunarefninu til að ákvarða hvort áhrifin ganga til baka. Komi í ljós, áður en liðnir eru 21 dagar, að áhrifin ganga til baka skal tilrauninni strax hætt.

1.4.2.7.1. *Klínískar athuganir og flokkun augnsvörunar*

Augun eru skoðuð eftir 1, 24, 48 og 72 klukkustundir frá ídreypingu prófunarefnisins. Dýrunum skal ekki haldið lengur í prófuninni en nauðsynlegt er til að afla ótvíræðra upplýsinga. Dýr sem sýna viðvarandi merki um mikinn sársauka eða þjáningu skulu aflífuð þegar í stað á mannúðlegan hátt og efnið metið í samræmi við þetta. Aflífa skal dýr á mannúðlegan hátt hafi þau fengið eftirfarandi augnskemmdir eftir ídreypingu: göt á glæru eða umtalsverða sáramyndun á glæru, þ.m.t. bungun, blóð í fremra hólfi augans, 4. stigs ógagnsæi glæru sem varir í 48 klukkustundir, enga ljósvörun (2. stigs lithimnusvörun) í 72 klukkustundir, sáramyndun á táru, drep í táru eða blikhimnu eða myndun drepvefjar. Ástæðan er sú að venjulega ganga þessar vefjaskemmdir ekki til baka.

Ekki má aflífa dýr, sem ekki fá augnskemmdir, fyrr en þremur dögum eftir ídreypingu. Fylgst skal með dýrum með augnskemmdir, sem eru vægar eða í meðallagi, þar til augnskemmdirnar hverfa, eða í 21 dag, og skal prófuninni þá hætt. Athuganir skulu gerðar á 7., 14. og 21. degi til að ákvarða umfang skemmdanna og hvort þær geti gengið til baka eða ekki.

Við hverja athugun skal skrá stig augnsvörunar (í slímhimnu, glæru og lithimnu) (sjá 1. töflu). Einnig skal skýra frá öðrum skemmdum á auga (s.s. æðavagli á glæru og litun) eða skaðlegum, altækum verkunum.

Auðvelda má athugun á viðbrögðum með því að nota stækkunargler fyrir bæði augu, færanlegan raufarlampa, augnsjá eða annað hentugt tæki. Þegar athuganir eftir 24 klukkustundir hafa verið skráðar má skoða augun nánar með aðstoð flúrskinslausnar.

Flokkun augnsvörunar er í eðli sínu huglæg. Til að stuðla að samræmingu á flokkun augnsvörunar og til að aðstoða rannsóknarstofur og aðra hlutaðeigandi aðila við athuganir sínar og túlkun niðurstaðna úr þeim þarf að kenna starfsfólkinu, sem vinnur við þessar athuganir, nægilega vel á stigakerfið sem er notað.

2. GÖGN

2.2. MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal augnertinguna til stiga í tengslum við eðli og alvarleika vefjaskemmda og hvort skemmdirnar geti gengið til baka eða ekki. Stigafjöldinn í hverju einstöku tilviki er ekki algild viðmiðun fyrir ertingareiginleika prófunarefnis þar eð önnur áhrif efnisins eru einnig metin. Í stað þess ber að líta á stigagjöf í hverju einstöku tilviki sem viðmiðunargildi enda hafa stigin enga merkingu nema þeim fylgi fullnægjandi lýsing og mat á öllum athugunum sem fram fóru.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Rökstuðningur fyrir prófun í lífi: greining á vægi rökstuddra vísbendinga í gögnum sem lágu fyrir áður en prófun hófst, þ.m.t. niðurstöður úr raðprófunaráætlun:

— lýsing á viðeigandi gögnum sem liggja fyrir úr fyrri prófunum,

— gögn úr einstökum áföngum prófunaráætlunarinnar,

— lýsing á þeim prófunum í glasi sem fram fóru, þ.m.t. ítarleg lýsing á þeim verkferlum, sem voru notuð, og niðurstöðum sem fengust með prófunar- og viðmiðunarefnum,

— lýsing á húðertingar- eða húðætingarrannsókninni í lífi sem var gerð, þ.m.t. niðurstöðurnar sem fengust,

— greiningin á vægi rökstuddra vísbendinga sem lá til grundvallar rannsókninni í lífi.

Prófunarefni:

— auðkennisgögn (t.d. CAS-númer, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi og lotunúmer),

— eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni, leysni, stöðugleiki og hvarfgirni við vatn),

— ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutföll efnisþátta (í %),

— ef notað er staðdeyfilyf: auðkenni, hreinleiki, tegund, skammtur og hugsanleg víxlverkun við prófunarefnið.

Burðarefni:

— auðkenni, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað,

— rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð og ef notuð eru önnur dýr en kanínuhvítingjar skal það rökstutt,

— aldur hvers dýrs í upphafi rannsóknar,

— fjöldi dýra af hvoru kyni í prófunar- og samanburðarhópum (eftir atvikum),

— þyngd hvers dýrs við upphaf og lok prófunar,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.

Niðurstöður:

— lýsing á aðferð til að meta ertingu til stiga á hverjum athugunartíma (t.d. færanlegur raufarlampi, augnsjá og flúrskinslausn),

— töflusetning ertingar-/ætingarsvörunar fyrir hvert einstakt dýr á hverjum athugunartíma fram að því að dýrið er tekið úr prófuninni,

— lýsing í samfelldu máli á styrk og eðli þeirrar ertingar eða ætingar sem kom fram,

— lýsing á öðrum augnskemmdum (t.d. æðun, myndun æðavagls á glæru, samgróningar og litun),

— lýsing á öllum staðbundnum og skaðlegum, altækum áhrifum utan augans sjálfs og vefjameina-fræðilegar niðurstöður, ef einhverjar eru.

Umfjöllun um niðurstöður.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Niðurstöður úr augnertingarrannsóknum á tilraunadýrum verða aðeins yfirfærðar að takmörkuðu leyti á menn. Í mörgum tilvikum eru kanínuhvítingjar næmari en menn fyrir augnertandi eða augnætandi efnum.

Við túlkun gagna skal þess gætt að útiloka ertingu sem stafar af fylgisýkingu.

4. **HEIMILDIR**

1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, bls. 410-429.

2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N., (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, bls. 159-164.

3) Worth A.P. and Fentem J.H., (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, bls. 161-177

4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicollogy In Vitro, 2, bls. 19-26.

5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, bls. 227-231.

6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, bls. 483-524.

(6a) Prófunaraðferð B.40: Húðæting.

7) Prófunaraðferð B.4. Bráð eiturhrif: húðerting/húðæting.

8) OECD, (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

9) OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

10) OECD, (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

TAFLA I

FLOKKUN AUGNSKEMMDA

Glæra

Ógagnsæi: þéttleikastig (þéttasta svæðið er metið) (*)

Engin sáramyndun eða ógagnsæi	0
Dreifð eða óljós svæði þar sem fram kemur ógagnsæi (annað en að eðlilegur gljái dofni lítillega), smáatriði í lithimnu eru mjög greinileg	1
Auðgreinanlegt, hálfgagnsætt svæði, smáatriði í lithimnu örlítið óskýr	2
Perlumóðurlitað svæði, smáatriði í lithimnu ekki greinanleg, erfitt er að meta stærð sjáaldurs …	3
Ógagnsæ glæra, lithimnan ógreinanleg vegna ógagnsæis	4

Hámarksgildi: 4.

ATHUGASEMDIR
(*) Skrá skal stærð svæðisins þar sem glæran er ógagnsæ

Lithimna

Eðlileg	0
Merkjanlega dýpri fellingar, vökvasókn, bólga, blóðsöfnun í kringum glæruna í meðallagi eða mikil blóðfylling smáæða,	
lithimna bregst við ljósi (litið er á hægt viðbragð sem áhrif)	1
Blæðing, stórsæjar skemmdir, engin svörun við ljósi	2

Hámarksgildi: 2.

Tára

Roði (hér er átt við slímhúð augnloks og táru en ekki glæru eða lithimnu)

Eðlileg	0
Sumar æðar greinilega blóðríkar (blóðfylltar)	1
Dreifður, djúprauður litur, einstakar æðar ekki auðgreinanlegar	2
Dreifður, dimmrauður litur	3

Hámarksgildi: 3.

Tárubjúgur (e. *chemosis*)

Bólga (hér er átt við augnlok og/eða blikhimnu)

Eðlileg	0
Dálítil bólga umfram það sem er eðlilegt	1
Greinileg bólga, augnlokin verða að hluta úthverf	2
Bólga, augnlokin eru u.þ.b. hálflokuð	3
Bólga, augnlokin eru meira en hálflokuð	4

Hámarksgildi: 4.

Viðbætir

Raðprófunaráætlun fyrir augnertingu og augnætingu

ALMENN ATRIÐI

Til að stuðla jafnt að vísindalegum gæðum sem velferð dýra er mikilvægt að nota ekki tilraunadýr að nauðsynjalausu og lágmarka prófanir sem líklegt er að kalli fram mikla svörun hjá dýrum. Allar upplýsingar um efni, sem varða hugsanlega augnertingar- eða augnætingareiginleika þess, skulu metnar áður en hugað er að prófun í lífi. Hugsanlegt er að þegar liggi fyrir nægilegar upplýsingar til að flokka viðkomandi prófunarefni með tilliti til augnertingar- eða augnætingarmáttar þess án þess að gera þurfi prófanir á tilraunadýrum. Greining á vægi rökstuddra vísbendinga og notkun raðprófunaráætlunar lágmarka því þörfina á prófun í lífi, einkum ef efnið er líklegt til að kalla fram mikla svörun.

Mælt er með því að fram fari greining á vægi rökstuddra vísbendinga til að meta fyrirliggjandi upplýsingar um augnertingar- og augnætingarmátt efna í því skyni að ákvarða hvort rétt sé að gera frekari rannsóknir, aðrar en augnrannsóknir í lífi, sem hjálpað geta við lýsingu á þeim mætti. Sé þörf á frekari rannsóknum er mælt með því að notuð sé raðprófunaráætlun til að afla viðeigandi tilraunagagna. Þegar um er að ræða efni sem hafa ekki verið prófuð áður skal nota raðprófunaráætlun við öflun þeirra gagna sem þarf til að meta augnætingar- eða augnertingarmátt efnanna. Prófunaráætlunin, sem lýst er í þessum viðbæti, var samin á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (1. heimild). Hún var síðar staðfest og aukin fyrir samræmda og samþætta kerfið til hættuflokkunar á áhrifum íðefna á heilbrigði manna og umhverfið sem var samþykkt á 28.s sameiginlega fundi íðefnanefndar og íðefnavinnuhóps stofnunarinnar í nóvember 1998 (2. heimild)

Þótt þessi prófunaráætlun sé ekki órofa hluti af prófunaraðferð B.5 er hún sú áætlun sem mælt er með til að ákvarða augnertingar- eða augnætingareiginleika. Áætlunin felur bæði í sér bestu starfsvenjur og siðareglur fyrir prófun í lífi á augnertingu eða augnætingu. Í lýsingu á prófunaraðferðinni eru gefnar leiðbeiningar um framkvæmd prófana í lífi og tekin saman þau atriði sem þarf að afgreiða áður en til greina kemur að gera slíka prófun. Í raðprófunaráætluninni er greining á vægi rökstuddra vísbendinga notuð sem aðferð til að meta fyrirliggjandi gögn um augnertingar- eða augnætingareiginleika efna og stigskipt aðferð notuð til að afla viðeigandi gagna um efni sem útheimta frekari rannsóknir eða sem engar rannsóknir hafa verið gerðar á. Samkvæmt áætluninni skal fyrst gera fullgiltar og viðurkenndar prófanir í lífi eða utan lífs og síðan rannsaka húðertandi eða húðætandi eiginleika samkvæmt aðferð B.4. við tilteknar aðstæður (3. og 4. heimild).

LÝSING Á ÞREPSKIPTRI PRÓFUNARÁÆTLUN

Áður en gerðar eru prófanir, sem eru hluti af raðprófunaráætlun (sjá mynd), skal meta allar fyrirliggjandi upplýsingar til að ákvarða þörfina á augnprófun í lífi. Vera kann að afla megi mikilvægra upplýsinga með mati á einstökum áhrifaþáttum (t.d. mjög háu eða mjög lágu sýrustigi) en þó ber að meta allar fyrirliggjandi upplýsingar í heild sinni. Öll viðeigandi gögn um áhrif efnisins, sem um er að ræða, og áhrif efna með hliðstæða byggingu skulu metin þegar tekin er ákvörðun á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga og skal rökstyðja ákvörðunina. Leggja skal megináherslu á fyrirliggjandi gögn um áhrif efnisins á menn og dýr og því næst á útkomuna úr prófun í glasi og utan lífs. Reynt skal eftir megni að komast hjá rannsóknum í lífi á ætandi efnum. Eftirfarandi atriði skulu m.a. tekin til greina í prófunaráætluninni:

Mat á fyrirliggjandi gögnum um menn og dýr (1. þrep). Fyrst skal skoða fyrirliggjandi gögn um áhrif á menn, t.d. úr klínískum rannsóknum og rannsóknum á starfsumhverfi, og tilfellaskýrslur og/eða gögn úr prófunum á dýrum, t.d. úr augnrannsóknum, þar eð þessi gögn veita beinar upplýsingar um áhrif á augu. Því næst skal meta fyrirliggjandi gögn úr rannsóknum á mönnum og/eða dýrum þar sem húðæting eða húðerting var könnuð. Liggi fyrir vitneskja um að efni hafi ætandi eða mjög ertandi áhrif á augu skal ekki bera það í augu dýra né efni sem sýnt hefur verið fram á að hafi ætandi eða ertandi áhrif á húð enda skal líta svo á að slík efni hafi einnig ætandi og/eða ertandi áhrif á augu. Ekki skal heldur prófa efni í augnrannsóknum í lífi ef fullnægjandi sannanir hafa fengist fyrir því í fyrri augnrannsóknum að efnin séu óætandi og óertandi.

Greining á venslum efnabyggingar og virkni (2. þrep). Skoða skal niðurstöður úr prófunum á efnum með skylda byggingu ef þær eru fyrir hendi. Ef fyrir liggja gögn um áhrif á menn og/eða dýr frá efnum með skylda byggingu eða blöndum slíkra efna og gögnin nægja til að sýna augnætingar- eða augnertingarmátt þeirra má ganga út frá því að prófunarefnið framkalli sömu svörun. Þegar svo er þarf e.t.v. ekki að prófa efnið. Neikvæð gögn úr rannsóknum á efnum með skylda efnabyggingu eða blöndum slíkra efna eru ekki næg sönnun, samkvæmt raðprófunaráætluninni, fyrir því að tiltekið efni sé óætandi eða óertandi. Nota skal fullgiltar og viðurkenndar aðferðir með venslum efnabyggingar og virkni til að sanngreina ætingar- og ertingarmátt, bæði að því er varðar áhrif á húð og augu.

Eðlisefnafræðilegir eiginleikar og hvarfgirni (3. þrep). Efni með óvenjulega hátt eða lágt sýrustig, t.d. $\leq 2{,}0$ eða $\geq 11{,}5$, geta haft mikil, staðbundin áhrif. Ef óvenjuhátt eða -lágt sýrustig er notað til að staðfesta að efni er augnætandi eða augnertandi er eðlilegt að skoða einnig sýru- eða basaforða (jafnarýmd) efnisins (5. og 6. heimild). Ef jafnarýmdin gefur til kynna að efnið sé ekki augnætandi skal gera frekari prófanir til að staðfesta þetta og er ákjósanlegast að nota fullgilta og viðurkennda prófun í glasi eða utan lífs (sjá 5. og 6. þrep).

Mat á öðrum fyrirliggjandi upplýsingum (4. þrep) Á þessu stigi skal meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um altæk eiturhrif við íkomuleið um húð. Einnig skal huga að bráðum eiturhrifum prófunarefnisins á húð. Ef sýnt hefur verið fram á að prófunarefnið sé mjög eitrað við íkomuleið um húð kann að vera óþarfi að prófa það á augum. Þótt ekki sé sjálfgefið að samband ríki milli bráðra eiturhrifa á húð og augnertingar eða augnætingar má gera ráð fyrir því að efni, sem er mjög eitrað við íkomuleið um húð, sýni líka mikil eiturhrif þegar því er dreypt í auga. Þessi gögn má einnig skoða milli 2. og 3. þreps.

Niðurstöður úr prófunum í glasi eða utan lífs (5. og 6. þrep). Ekki þarf að prófa efni á dýrum ef sýnt hefur verið fram á að efnin séu ætandi eða mjög ertandi í prófun í glasi eða utan lífs (7. og 8. heimild) sem hefur verið fullgilt og viðurkennd sérstaklega fyrir mat á ætingu eða ertingu í augum eða húð. Ganga má út frá því að slík efni hafi svipuð áhrif í lífi. Ef engar niðurstöður úr fullgiltum og viðurkenndum prófunum í glasi eða utan lífs eru fyrir hendi skal sleppa 5. og 6. þrepi og fara beint upp á 7. þrep.

Mat í lífi á húðertingar- eða húðætingareiginleikum efnisins (7. þrep). Ef gögn úr framangreindum rannsóknum nægja ekki til ótvíræðrar greiningar á vægi rökstuddra vísbendinga með tilliti til hugsanlegra augnertandi eða augnætandi áhrifa efnis skal fyrst meta húðertingar- eða húðætingarmátt þess í lífi með aðferð B.4 (4. heimild) og viðbætinum við lýsinguna á aðferðinni (9. heimild). Ef sýnt hefur verið fram á að efnið valdi ætingu eða mikilli húðertingu ber að líta svo á að það sé ætandi og ertandi fyrir augun nema aðrar upplýsingar gefi tilefni til annarrar niðurstöðu. Þá þarf ekki að gera augnprófun í lífi. Ef efnið er hvorki húðætandi né mjög húðertandi skal gera augnprófun í lífi.

Prófun í lífi á kanínum (8. og 9. þrep): hefja skal prófun í lífi á augum með upphafsprófun með einu dýri. Ef niðurstöður úr þessari prófun sýna að efnið er mjög augnertandi eða augnætandi skal ekki gera frekari prófanir. Leiði prófunin hvorki í ljós ætandi né mjög ertandi áhrif er gerð staðfestingarprófun með tveimur dýrum til viðbótar.

HEIMILDIR

1) OECD, (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

2) OECD, (1998) Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

3) Worth, A.P. and Fentem J.H., (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, bls. 161-177.

4) Prófunaraðferð B.4. Bráð eiturhrif: húðerting/húðæting.

5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H., (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicolohy In Vitro, 27, bls. 19-26.

6) Neun, D.J., (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, bls. 227-231.

7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, bls. 483-524.

8) Prófunaraðferð B.40: Húðæting.

9) Viðauki við prófunaraðferð B.4: raðprófunaráætlun fyrir húðertingu og húðætingu.

Mynd

PRÓFUNAR- OG MATSÁÆTLUN FYRIR AUGNERTINGU/AUGNÆTINGU

	Virkni	Niðurstaða	Niðurstaða
1.	Fyrirliggjandi gögn um menn og/eða dýr sýna áhrif á augu	Alvarlegar augnskemmdir	Endapunktur: skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á prófun.
		Augnertandi	Endapunktur: skal teljast augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
		Ekki augnætandi/ekki augnertandi	Endapunktur: hvorki talið augnætandi né augnertandi. Ekki er krafist prófunar.
	Fyrirliggjandi gögn um menn og/eða dýr sýna áhrif á húð	Húðætandi	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	Fyrirliggjandi gögn um menn og/eða dýr sýna alvarleg, ertandi áhrif á húð	Mjög húðertandi	Gera skal ráð fyrir að efnið sé augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Upplýsingar ekki fyrirliggjandi eða ekki afdráttarlausar		
	↓		
2.	Framkvæma skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni með tilliti til augnætingar eða augnertingar	Vænta má alvarlegra augnskemmda	Gera skal ráð fyrir augnætingareiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
		Vænta má augnertingar	Gera skal ráð fyrir að efnið sé augnertandi. Ekki er þörf á prófun.
	Framkvæma skal greiningu á venslum efnabyggingar og virkni með tilliti til húðætingar	Vænta má húðætingareiginleika.	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Ekki er hægt að setja fram spár eða spár eru óljósar eða neikvæðar		
	↓		
3.	Sýrustig skal mælt (jafnarýmd ef við á)	pH ≤ 2 eða ≥ 11,5 (með mikilli jafnarýmd, ef við á)	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	2 < pH < 11,5 eða pH ≤ 2,0 eða ≥ 11,5 með lítilli eða engri jafnarýmd, ef við á		
	↓		
4.	Meta skal altæk eiturhrif við íkomuleið um húð	Mjög eitrað í þeim styrkleikum sem yrðu notaðir við prófun efnis í augum.	Efnið er of eitrað fyrir prófun. Ekki er þörf á prófun.
	↓		
	Þessar upplýsingar eru ekki fyrirliggjandi eða efnið er ekki mjög eitrað		
	↓		

5.	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda augnætingar-prófun í glasi eða utan lífs	Ætandi svörun	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Efnið er ekki ætandi eða fullgiltar aðferðir til prófunar í glasi eða utan lífs á augnætingu liggja ekki fyrir enn sem komið er		
	↓		
6.	Framkvæma skal fullgilta og viðurkennda augnætingar-prófun í glasi eða utan lífs	Ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Efnið er ekki ertandi eða fullgiltar aðferðir til prófunar í glasi eða utan lífs á augnertingu liggja ekki fyrir enn sem komið er		
	↓		
7.	Gera skal tilraun í lífi til að meta húðertingar- eða húðætingarmátt (sjá prófunaraðferð B.4 ásamt viðauka)	Ætandi svörun eða mikil ertandi svörun	Gera skal ráð fyrir augnætingar-eiginleikum. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Efnið er hvorki húðætandi né mjög húðertandi		
	↓		
8.	Framkvæma skal augnprófun í lífi á kanínu og skal aðeins nota eitt dýr	Alvarlegar augnskemmdir	Skal teljast augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
	↓		
	Engar alvarlegur skemmdir eða engin svörun		
	↓		
9.	Framkvæma skal staðfestingarprófun með einu eða tveimur dýrum til viðbótar	Ertandi eða ætandi	Skal teljast augnætandi eða augnertandi. Ekki er þörf á frekari prófun.
		Hvorki ætandi né ertandi	Skal hvorki teljast augnertandi né augnætandi. Ekki er þörf á frekari prófun.

B.6. **HÚÐNÆMING**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Athugasemdir:

Í flokkunarkerfi fyrir eiturhrif sem varða almannaheilbrigði telst mikilvægt að til séu næmar prófunaraðferðir sem eru til þess fallnar að finna efni sem geta valdið húðnæmingu hjá mönnum.

Engin ein prófunaraðferð er til sem nota má til að sanngreina á fullnægjandi hátt öll efni sem geta valdið húðnæmingu hjá mönnum og sem hentar á öll efni.

Þegar prófun er valin verður að taka tillit til þátta á borð við eðliseiginleika efna, m.a. hæfni þeirra til að smjúga gegnum húð.

Þróaðar hafa verið tvær gerðir prófana þar sem naggrísir eru notaðir: prófanir með ónæmisglæðum, en þar er ofnæmisástand magnað með því að útbúa lausn eða svifblöndu úr prófunarefninu í fullkomnum ónæmisglæði Freunds (e. *Freund's complete adjuvant* (FCA)), og prófanir án ónæmisglæða.

Með ónæmisglæðaprófunum má að jafnaði segja fyrir um líkleg húðnæmandi áhrif efna hjá mönnum með nákvæmari hætti en með aðferðum þar sem fullkominn ónæmisglæðir Freunds er ekki notaður og eru hinar fyrrtöldu því æskilegri.

Hámörkunarprófun á naggrísum (e. *Guinea-Pig Maximisation Test* (GPMT)) er algeng ónæmisglæðaprófun. Þó að nota megi nokkrar aðrar aðferðir til að greina mátt efnis til að kalla fram húðnæmingarviðbrögð er hámörkunarprófun á naggrísum talin ákjósanlegasta ónæmisglæðaaðferðin.

Prófanir án ónæmisglæðis (sú ákjósanlegasta er Buehler-prófunin) teljast minna næmar fyrir marga íðefnaflokka.

Í ákveðnum tilvikum getur verið gild ástæða til að velja Buehler-prófun þar sem efnið er borið á staðbundið í stað þess að sprauta því í húð eins og í hámörkunarprófun á naggrísum. Þegar Buehler-prófunin er notuð skal færa vísindaleg rök fyrir því.

Í þessari aðferð er gefin lýsing á hámörkunarprófun á naggrísum og Buehler-prófun. Nota má aðrar aðferðir, að því tilskildu að þær hafi fengið næga fullgildingu og að færð séu vísindaleg rök fyrir notkun þeirra.

Ef jákvæðar niðurstöður fást úr viðurkenndri skimunarprófun má tilgreina prófunarefnið sem hugsanlegan næmi og vera kann að ekki þurfi að gera frekari prófanir á naggrísum. Ef niðurstöður úr slíkri prófun eru hins vegar neikvæðar skal framkvæma naggrísaprófunina og nota verkferlið sem lýst er í þessari prófunaraðferð.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Húðnæming: (húðbólga vegna snertiofnæmis) er ónæmisbundið viðbragð í húð við efni. Í mönnum getur svörun komið fram í kláða, hörundsroða, bjúg, nöbbum, bólum, blöðrum eða samblandi af þessu. Í öðrum tegundum geta viðbrögðin verið önnur, t.d. aðeins hörundsroði og bjúgur.

Vakningarváhrif: viðfang er í tilraunaskyni látið verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu með það fyrir augum að framkalla ofurnæmi.

Vakningartímabil: tímabil, a.m.k. vika, eftir vakningarváhrif þar sem ofurnæmi getur myndast.

Ögrunarváhrif: viðfang, sem hefur áður fengið meðferð með prófunarefni, er í tilraunaskyni látið verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu eftir að vakningartímabilinu lýkur til að ákvarða hvort ofurnæmisviðbrögð komi fram hjá viðfanginu.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Meta skal næmleika og áreiðanleika tilraunatækninnar á sex mánaða fresti með því að nota efni sem vitað er að hafa væga eða hóflega húðnæmingareiginleika.

Í prófun, sem rétt er staðið að, má hjá vægum eða hóflegum næmum búast við a.m.k. 30% svörun í ónæmisglæðaprófun og a.m.k. 15% í prófun án ónæmisglæða.

Mælt er með eftirfarandi efnum:

CAS-númer	EINECS-númer	EINECS-heiti	Almenn heiti
101-86-0	202-983-3	α-hexýlsinnamaldehýð	α-hexýlsinnamaldehýð
149-30-4	205-736-8	bensóþíasól-2-þíól (merkaptóbensóþíasól)	kaptax
94-09-7	202-303-5	bensókaín	norkaín

Við vissar aðstæður má nota önnur samanburðarefni, sem uppfylla áðurgreind skilyrði, þegar gild rök eru fyrir því.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Í upphafi eru tilraunadýrin látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefni sem sprautað er í húðina og/eða borið á hana (vakningarváhrif). Eftir 10–14 daga hvíldartíma (vakningartímabil), en þá getur þróast ónæmissvörun, er dýrunum gefinn ögrunarskammtur. Umfang og styrkur húðviðbragða við ögrunarváhrifum hjá prófunardýrunum er borið saman við það sem kemur fram hjá samanburðardýrum sem fá sýndarmeðferð á vakningartímabilinu og fá síðan ögrunarskammt.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐUNUM

Ef nauðsynlegt er talið að fjarlægja prófunarefnið ber að nota til þess vatn eða hentugan leysi sem breytir ekki þeirri svörun sem hefur komið fram og skaðar ekki húðþekjuna.

1.5.1. *Hámörkunarprófun á naggrísum*

1.5.1.1. Undirbúningur

Heilbrigðir, ungir, fullvaxnir naggrísahvítingjar eru látnir aðlagast aðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga áður en prófun hefst. Fyrir prófun eru dýr valin af handahófi og skipað í meðferðarhópana. Hár er klippt eða rakað af eða hugsanlega fjarlægt með háreyðingarefni, eftir því hvaða prófunaraðferð er notuð. Gæta skal þess að skaða ekki húðina. Dýrin eru vigtuð áður en prófunin hefst og þegar henni lýkur.

1.5.1.2. Prófunarskilyrði

1.5.1.2.1. Tilraunadýr

Notaðir eru naggrísahvítingjar af algengum rannsóknarstofustofnum.

1.5.1.2.2. Fjöldi og kyn

Nota má kvendýr og/eða karldýr. Ef kvendýr eru notuð skulu þau vera eibær og ekki með fangi.

Nota skal minnst 10 dýr í meðferðarhópnum og a.m.k. 5 dýr í samanburðarhópnum. Þegar notaðir eru færri en 20 tilraunanaggrísir og 10 samanburðarnaggrísir og ekki fæst úr því skorið hvort prófunarefnið sé næmir er eindregið mælt með því að prófa efnið á fleiri dýrum þannig að tilraunadýrin verði a.m.k. 20 samtals og samanburðardýrin 10.

1.5.1.2.3. Skammtastærðir

Sá styrkur prófunarefnisins, sem notaður er til vakningarváhrifa hverju sinni, skal vera vel þolanlegur fyrir öll kerfi líkamans og skal vera mesti styrkur sem veldur vægri eða hóflegri ertingu í húð. Styrkur til ögrunarváhrifa skal vera mesti styrkur efnisins sem veldur ekki húðertingu. Viðeigandi styrkleikastig skal ákvarða með forkönnun með tveimur til þremur dýrum ef aðrar upplýsingar eru ekki fáanlegar. Til greina getur komið að nota til þess dýr sem hafa fengið meðferð með fullkomnum ónæmisglæði Freunds.

1.5.1.3. Verkferli

1.5.1.3.1. Vakning

Núlldagur – meðferðarhópur

Sprautað er úr þremur sprautupörum, 0,1 ml hver sprauta, í húðina á herðakambinum, sem áður er búið að fjarlægja hár af, þannig að sprauturnar í hverju sprautupari eru gefnar sín hvoru megin við hrygginn.

1. sprauta: blanda í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) af fullkomnum ónæmisglæði Freunds/vatni eða lífeðlisfræðilegri saltlausn.

2. sprauta: prófunarefnið í heppilegu burðarefni af þeim styrk sem er valinn.

3. sprauta: prófunarefnið, í þeim styrk sem er valinn, í blöndu í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) af fullkomnum ónæmisglæði Freunds/vatni eða lífeðlisfræðilegri saltlausn.

Í 3. sprautu eru vatnsleysanleg efni leyst í vatnsfasanum áður en þeim er blandað saman við fullkominn ónæmisglæði Freunds. Útbúin er svifblanda úr fituleysanlegum eða óleysanlegum efnum í í fullkomnum ónæmisglæði Freunds og þessu síðan blandað saman við vatnsfasann. Endanlegur styrkur prófunarefnisins skal vera sá sami og í 2. sprautu.

Fyrstu og annarri sprautu er sprautað þétt saman, næst höfðinu, en þeirri þriðju aftast á prófunarsvæðinu.

Núlldagur – samanburðarhópur

Sprautað er úr þremur sprautupörum, 0,1 ml, á sömu staði og hjá meðferðardýrunum.

1. sprauta: blanda í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) af fullkomnum ónæmisglæði Freunds/vatni eða lífeðlisfræðilegri saltlausn.

2. sprauta: óblandað burðarefni.

3. sprauta: 50% af burðarefni, þyngd á móti rúmmáli, í blöndu í hlutfallinu 1:1 (rúmmálshlutfall) af fullkomnum ónæmisglæði Freunds/vatni eða lífeðlisfræðilegri saltlausn.

5.–7. dagur – meðferðarhópur og samanburðarhópur

Ef efnið ertir ekki húðina er framkölluð staðbundin húðerting, u.þ.b. 24 klukkustundum fyrir staðbundna vakningaráburðinn, með því að bera 0,5 ml af 10% natríumlárýlsúlfati í vaselíni á prófunarsvæðið eftir að það hefur verið snöggklippt og/eða rakað.

6.–8. dagur – meðferðarhópur

Á ný er allt hár hreinsað af prófunarsvæðinu. Síupappír (2 × 4 cm) er gegnbleyttur með prófunarefninu sem er blandað saman við heppilegt burðarefni, settur á prófunarsvæðið og haldið í snertingu við það með loftþéttum umbúðum í 48 klukkustundir. Rökstyðja skal val á burðarefni. Föst efni eru fíndyft og þeim blandað í hæfilegt burðarefni. Vökva má nota óþynnta ef það hentar.

6.–8. dagur – samanburðarhópur

Á ný er allt hár hreinsað af prófunarsvæðinu. Óblandað burðarefni er sett á prófunarsvæðið á sama hátt og haldið í snertingu við það með loftþéttum umbúðum í 48 klukkustundir.

1.5.1.3.2. Ögrun

20.–22. dagur – meðferðarhópur og samanburðarhópur

Hár er hreinsað af huppum meðferðar- og samanburðardýra. Plástur eða hylki með prófunarefninu er fest á annan hupp dýrsins og, þegar það á við, má festa plástur eða hylki með burðarefninu einu á hinn huppinn. Plástrunum er haldið í snertingu við húðina með loftþéttum umbúðum í 24 klukkustundir.

1.5.1.3.3. Athugun og flokkun: meðferðar- og samanburðarhópur

— u.þ.b. 21 klukkustund eftir að plásturinn er fjarlægður er ögrunarsvæðið hreinsað og snöggklippt og/eða rakað ef með þarf,

— u.þ.b. þremur klukkustundum síðar (um 48 klukkustundum eftir að byrjað var að bera ögrunar-skammtinn á) eru viðbrögð húðarinnar skoðuð og skráð samkvæmt flokkuninni sem er sýnd í viðbætinum,

— u.þ.b. 24 klukkustundum eftir þessa athugun er önnur athugun gerð (72 klst.) og skráð.

Mælt er með því að sá sem athugar dýrin viti ekki hvort þau eru úr meðferðar- eða samanburðarhópi.

Ef nauðsynlegt er að skýra niðurstöðurnar úr fyrstu ögrunarmeðferð kemur til greina að endurtaka hana (endurögrun), hugsanlega með nýjum samanburðarhópi, viku eftir fyrstu ögrun. Einnig má nota upphaflega samanburðarhópinn í endurtekinni ögrunarmeðferð.

Athuga skal og skrá öll húðviðbrögð og allt óvenjulegt, þar á meðal altæka svörun við vakningu og ögrun með efninu, samkvæmt flokkunarkvarða Magnusson/Kligman (sjá viðbæti). Nota má aðrar aðferðir, t.d. vefjameinafræðilegar rannsóknir og mælingar á þykknun húðar, til að taka af vafa þegar viðbrögð eru ekki ótvíræð.

1.5.2. *Buehler-prófun*

1.5.2.1. Undirbúningur

Heilbrigðir, ungir, fullvaxnir naggrísahvítingjar eru látnir aðlagast aðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga áður en prófun hefst. Fyrir prófun eru dýr valin af handahófi og skipað í meðferðarhópana. Hár er klippt eða rakað af eða hugsanlega fjarlægt með háreyðingarefni, eftir því hvaða prófunaraðferð er notuð. Gæta skal þess að skaða ekki húðina. Dýrin eru vigtuð áður en prófunin hefst og þegar henni lýkur.

1.5.2.2. Prófunarskilyrði

1.5.2.2.1. Tilraunadýr

Notaðir eru naggrísahvítingjar af algengum rannsóknarstofustofnum.

1.5.2.2.2. Fjöldi og kyn

Nota má kvendýr og/eða karldýr. Ef kvendýr eru notuð skulu þau vera eibær og ekki með fangi.

Nota skal minnst 20 dýr í meðferðarhópnum og a.m.k. 10 dýr í samanburðarhópnum.

1.5.2.2.3. Skammtastærðir

Sá styrkur prófunarefnisins, sem notaður er til vakningarváhrifa hverju sinni, skal vera mesti mögulegi styrkur sem veldur vægri en ekki of mikilli ertingu í húð. Styrkur til ögrunarváhrifa skal vera mesti styrkur

efnisins sem veldur ekki húðertingu. Ef þörf krefur er hægt að ákvarða hæfilegan styrk í forprófun þar sem tvö eða þrjú dýr eru notuð.

Þegar um er að ræða vatnsleysanleg efni er rétt að nota vatn eða þynnta, óertandi lausn af yfirborðsvirku efni sem burðarefni. Þegar um er að ræða önnur prófunarefni er betra að nota 80% etanól-/vatnsblöndu fyrir vakningu og aseton fyrir ögrun.

1.5.2.3. Verkferli

1.5.2.3.1. Vakning

Núlldagur – meðferðarhópur

Allt hár er hreinsað af öðrum huppi dýranna (snöggklippt). Prófunarplástrarnir skulu gegnvættir í prófunarefni, blönduðu hæfilegu burðarefni (val burðarefnis skal vera vel rökstutt, nota má fljótandi prófunarefni óblönduð þegar það á við).

Prófunarplástrarnir eru festir á prófunarsvæðið og haldið í snertingu við húðina í sex klukkustundir með loftþéttum plástri eða hylki og hæfilegum umbúðum.

Prófunarplástrarnir verða að vera loftþéttir. Bómullarpúði hentar vel og má vera hringlaga eða ferhyrndur en stærðin þarf að vera um 4–6 cm^2. Best er að takmarka hreyfingu dýranna með heppilegum aðhaldsbúnaði til að tryggja að umbúnaðurinn raskist ekki. Ef vafningar eru notaðir kann að vera þörf á beitingu frekari váhrifa.

Núlldagur – samanburðarhópur

Allt hár er hreinsað af öðrum huppi dýranna (snöggklippt). Burðarefnið eitt og sér er sett á dýrin á sama hátt og gert er við meðferðarhópinn. Prófunarplástrunum er haldið í snertingu við húðina með loftþéttu bindi eða hylki og hæfilegum umbúðum í sex klukkustundir. Ef hægt er að sýna fram á að ekki þurfi að nota samanburðarhóp sem fær sýndarmeðferð má nota samanburðarhóp sem hefur ekki gengist undir prófun.

6.–8. og 13.–15. dagur – meðferðarhópur og samanburðarhópur

Á 6.–8. degi og aftur á 13.–15. degi fá dýrin samskonar meðferð og á núlldegi, á sama prófunarsvæði (hár er fjarlægt ef þess þarf) og á sama huppnum.

1.5.2.3.2. Ögrun

27.–29. dagur – meðferðar- og samanburðarhópur

Hár er hreinsað (snöggklippt) af ómeðhöndluðum huppi dýranna í meðferðar- og samanburðarhópnum. Loftþéttur plástur eða hylki, sem í er hæfilegt magn af prófunarefninu í mesta styrk sem veldur ekki ertingu, er sett aftast á hupp meðferðar- og samanburðardýranna.

Þegar það á við má einnig setja loftþéttan plástur eða hylki með burðarefninu einu fremst á ómeðhöndlaðan hupp tilrauna- og samanburðardýranna. Plástrunum eða hylkjunum er haldið í snertingu við húðina í sex klukkustundir með heppilegum umbúðum.

1.5.2.3.3. Athugun og flokkun

— u.þ.b. 21 klukkustund eftir að plásturinn er fjarlægður er allt hár hreinsað af ögrunarsvæðinu,

— u.þ.b. þremur klukkustundum síðar (u.þ.b. 30 klukkustundum eftir að ögrunarplásturinn er settur á) eru viðbrögð húðar athuguð og skráð samkvæmt flokkuninni sem er sýnd í viðbætinum,

— u.þ.b. 24 klukkustundum eftir 30 klukkustunda athugunina (u.þ.b. 54 klukkustundum eftir að ögrunarplásturinn er settur á) eru viðbrögð húðar athuguð aftur og skráð.

Mælt er með því að sá sem athugar dýrin viti ekki hvort þau eru úr meðferðar- eða samanburðarhópi.

Ef nauðsynlegt er að skýra niðurstöðurnar úr fyrstu ögrunarmeðferð kemur til greina að endurtaka hana (endurögrun), hugsanlega með nýjum samanburðarhópi, viku eftir fyrstu ögrun. Einnig má nota upphaflega samanburðarhópinn í endurtekinni ögrunarmeðferð.

Athuga skal og skrá öll húðviðbrögð og allt óvenjulegt, þar á meðal altæka svörun við vakningu og ögrun með efninu, samkvæmt flokkunarkvarða Magnusson/Kligman (sjá viðbæti). Nota má aðrar aðferðir, t.d. vefjameinafræðilegar rannsóknir og mælingar á þykknun húðar, til að taka af vafa þegar viðbrögð eru ekki ótvíræð.

2. **GÖGN (hámörkunarprófun á naggrísum og Buehler-prófun)**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur svörun húðarinnar hjá hverju dýri í hverri athugun um sig.

3. **SKÝRSLUGERÐ (hámörkunarprófun á naggrísum og Buehler-prófun)**

Ef skimunarprófun er gerð á undan naggrísaprófuninni verður að gefa lýsingu á þeirri prófun eða vísa til hennar (t.d. bólguprófun á músareyra (e. *Mouse Ear Swelling Test* (MEST)), þar á meðal ítarlega lýsingu á verkferlinu, ásamt þeim niðurstöðum sem hafa fengist með notkun prófunar- og viðmiðunarefna.

Prófunarskýrsla (hámörkunarprófun á naggrísum og Buehler-prófun)

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

— naggrísastofninn sem er notaður,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

— aðferð við undirbúning svæðis fyrir grisjuplástra,

— upplýsingar um grisjuefnin og aðferð við plástrun,

— niðurstöður forkönnunar ásamt ályktun um hvaða vakningarstyrkleika og ögrunarstyrkleika beri að nota í prófuninni,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins og hvernig það er borið á og fjarlægt,

— rök fyrir vali á burðarefni,

— styrkleikar burðarefnis og prófunarefnis, sem eru notaðir til vakningar- og ögrunarváhrifa, og heildarmagn efna sem notuð eru til vakningar og ögrunar.

Niðurstöður:

— Samantekt á niðurstöðum síðustu athugunar á næmi og áreiðanleika (sjá 1.3), þar á meðal upplýsingar um efnið, styrkinn og burðarefnið sem eru notuð,

— upplýsingar um hvert einstakt dýr, þar á meðal flokkunarkerfi,

— lýsing í samfelldu máli á eðli og styrk áhrifanna sem koma í ljós,

— vefjameinafræðilegar niðurstöður.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

Þessi aðferð samsvarar OECD-viðmiðunarreglu 406 um prófanir.

Viðbætir

TAFLA

Flokkunarkvarði Magnusson/Kligman fyrir mat á svörunum í ögrunarprófun með plástrum

0 = engin sjáanleg breyting

1 = afmarkaður hörundsroði eða blettir

2 = hörundsroði í meðallagi og samfelldur

3 = mjög mikill hörundsroði og bólga

B.7. **EITURHRIF (UM MUNN) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrum hópum tilraunadýra er gefið prófunarefnið daglega um munn í stigskiptum skömmtum, ein skammtastærð fyrir hvern hóp, í 28 daga. Dýrin eru skoðuð daglega á inngjafartímabilinu til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

Í þessari aðferð er lögð meiri áhersla á taugafræðileg áhrif sem sérstakan endapunkt og áhersla er lögð á vandlegar klínískar athuganir á dýrunum til að fá fram eins miklar upplýsingar og unnt er. Aðferðin miðar að því að sanngreina íðefni sem geta valdið taugaeiturhrifum en slíkt getur gefið tilefni til meiri og ítarlegri rannsókna. Þar að auki geta komið fram vísbendingar um ónæmisfræðileg áhrif og eiturhrif í æxlunarlíffærum þegar þessari aðferð er beitt.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

Dýrunum er gefið prófunarefnið með magaslöngu eða í fóðri eða drykkjarvatni. Aðferðin við gjöf um munn ræðst af því hver tilgangurinn með rannsókninni er og eðlisefnafræðilegum eiginleikum efnisins.

Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/yrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins í burðarefninu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Tilraunadýr*

Rottur eru ákjósanlegasta nagdýrategundin þótt nota megi aðrar tegundir nagdýra. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Skammtagjöf ætti að hefjast eins fljótt og unnt er eftir fráfærur og í öllum tilvikum áður en þau ná níu vikna aldri.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

Ef rannsókn með endurteknum skömmtum um munn er undanfari langtímarannsóknar er ákjósanlegt að dýr af sama stofni og sama uppruna séu notuð í báðum rannsóknunum.

1.4.2.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst 10 dýr (fimm kvendýr og fimm karldýr) fyrir hverja skammtastærð. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar.

Að auki má meðhöndla 10 dýra fylgihóp (fimm dýr af hvoru kyni) með stærsta skammti í 28 daga og fylgjast með því í 14 daga eftir meðferð hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg eða síðkomin. Einnig er notaður fylgihópur með 10 samanburðardýrum (fimm af hvoru kyni).

1.4.2.3. *Skammtastærðir*

Almennt eru notaðir a.m.k. þrír prófunarhópar og samanburðarhópur. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður.

Ef mat á öðrum gögnum gefur ekki ástæðu til að vænta neinna áhrifa af skammti sem er 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag má framkvæma markprófun. Ef ekki eru til viðeigandi gögn er hægt að gera skammtastærðarrannsókn til að auðvelda ákvörðun á því hvaða skammta skuli nota.

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum gögnum um eiturhrif og eiturefnahvörf prófunarefnisins eða skyldra efna. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann valdi eiturhrifum en ekki dauða eða miklum þjáningum. Eftir það er valin röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10).

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vökvajafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort nota fastan styrk (í milljónarhlutum) í fóðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna en taka skal fram hvor kosturinn er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann eftir þörfum þannig að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins.

Þegar rannsókn með endurteknum skömmtum er undanfari langtímarannsóknar skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

1.4.2.4. *Markprófun*

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri eða drykkjarvatni (byggist á ákvörðun líkamsþyngdar), og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.4.2.5. *Athugunartímabil*

Athugunartímabilið skal vera 28 dagar. Dýrum í fylgihópi, sem ætlaður er til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í a.m.k. 14 daga í viðbót til að kanna hvort eiturhrifin eru síðkomin, varanleg eða ganga til baka.

1.4.3. **Verkferli**

Dýrin fá skammt af prófunarefninu daglega sjö daga í viku í 28 daga en ef efnið er gefið fimm daga í viku skal færa gild rök fyrir því. Ef prófunarefnið er gefið í maga skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

1.4.3.1. *Almennar athuganir*

Gera skal almennar, klínískar athuganir a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Skrá skal heilbrigðisástand dýranna. Öll dýr eru skoðuð a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til sjúkdómsástands og dauða. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikla þjáningu eða sársauka, skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

Gera skal ítarlegar, klínískar athuganir á öllum dýrunum, í eitt skipti á undan fyrstu váhrifum (til að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri) og a.m.k. vikulega eftir það. Þessar athuganir skulu fara fram í stöðluðu rými utan búrs dýranna og helst alltaf á sama tíma hverju sinni. Þær skulu vandlega skráðar og helst skal styðjast við stigakerfi sem prófunarstofan hefur skilgreint á skýran hátt. Leitast skal við að tryggja að prófunarskilyrðin séu sem jöfnust og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til meðferðarinnar. Merki sem fylgst er með skulu vera, en ekki takmarkast við, breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslosun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og vöðvakippi og vöðvaspennu, staðnað atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hringi) eða afbrigðilegt atferli (t.d. sjálfssköddun eða ef dýrin ganga aftur á bak).

Í fjórðu váhrifaviku skal meta skynviðbrögð við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- og sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri) og einnig skal meta gripstyrk og hreyfistarfsemi. Nánari lýsing á verkferlunum, sem fylgja má, er að finna í heimildunum (sjá almennan inngang að B-hluta).

Sleppa má athugunum á starfrænum þáttum í fjórðu váhrifaviku þegar um er að ræða forrannsókn sem er gerð sem undanfari 90 daga rannsóknar á hálflangvinnum eiturhrifum. Í þeim tilvikum ættu athuganir á starfrænum þáttum að vera hluti af síðari rannsókninni. Hins vegar geta upplýsingar um athuganir á starfrænum þáttum úr rannsókn með endurteknum skömmtum auðveldað valið á skammtastærðum fyrir síðari rannsóknir á hálflangvinnum eiturhrifum.

Í undantekningartilvikum má einnig sleppa athugunum á starfrænum þáttum þegar um er að ræða hópa sem sýna svo greinileg merki um eiturhrif að það myndi hafa veruleg áhrif á niðurstöður úr prófun á starfrænum þáttum.

1.4.3.2. *Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja*

Öll dýr skulu vigtuð a.m.k. vikulega. Mæla skal fóðurát og vatnsdrykkju a.m.k. vikulega. Ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju vikulega.

1.4.3.3. *Blóðfræði*

Í lok prófunartímabilsins skulu fara fram blóðrannsóknir varðandi eftirfarandi þætti: blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna, blóðflögufjölda og mælingu á storknunartíma og storkunarhæfni blóðs.

Taka skal blóðsýni á tilteknum stað, rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð, og geyma þau við hæfileg skilyrði.

1.4.3.4. *Klínísk lífefnafræði*

Gera skal klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum, sem tekin eru úr öllum dýrum rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð í rannsókninni), til að rannsaka helstu eiturhrif í vefjum, einkum áhrif á nýru og lifur. Mælt er með því að dýrin séu látin fasta nóttina áður en blóðsýnin eru tekin ([1]). Rannsóknir á blóðvökva eða sermi skulu ná yfir natríum, kalíum, glúkósa, heildarkólesteról, þvagefni, kreatínín, heildarprótín og albúmín og a.m.k. tvö ensím sem geta bent til áhrifa á lifrarfrumur (t.d. alanínamínótransferasa, aspartatamínótransferasa, basískan fosfatasa, gammaglútamýltranspeptíðasa og sorbítólvetnissvipti). Mælingar á fleiri ensímum (úr lifur eða öðrum líffærum) og gallsýrum geta í sumum tilvikum gefið gagnlegar upplýsingar.

([1]) Við allmargar mælingar á sermi og blóðvökva, einkum þegar glúkósi er mældur, er best að láta dýrin fasta yfir nótt. Aðalástæðan er sú að óhjákvæmilega verða niðurstöður breytilegri ef dýrin eru ekki látin fasta og það getur falið þau áhrif sem eru lítt áberandi og gert túlkun erfiðari. Hins vegar gæti fasta yfir nótt haft áhrif á almenn efnaskipti dýranna og það getur truflað dagleg váhrif frá prófunarefninu, einkum í rannsóknum þar sem efnið er gefið með fóðri. Ef dýrin eru látin fasta yfir nótt skulu klínískar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar eftir að athuganir á starfrænum þáttum í fjórðu viku rannsóknarinnar hafa farið fram.

Valkvætt er hvort eftirfarandi greiningar eru gerðar á þvagsýnum, sem tekin eru með tímasettri söfnun þvags, í síðustu viku rannsóknarinnar til ákvörðunar á útliti, magni, osmólastyrk eða eðlisþyngd, pH-gildi, prótíni, glúkósa og blóði/blóðkornum.

Að auki kemur til álita að rannsaka sermimerki sem benda til almennra vefjaskemmda. Aðrar mælingar, sem ætti að gera ef þekktir eiginleikar prófunarefnisins geta haft, eða grunur leikur á að þeir hafi, áhrif á tilsvarandi efnaskiptamynstur, eru mælingar á kalsíumi, fosfati, þríglýseríði við föstu, tilteknum hormónum, methemóglóbíni og kólínesterasa. Greina þarf þessa þætti þegar um er að ræða efni í tilteknum flokkum eða eftir því sem við á í hverju einstöku tilviki.

Almennt þarf nálgunin að vera sveigjanleg eftir dýrategundum og eftir þeim áhrifum tiltekins efnis sem koma fram og/eða búist er við.

Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega að mæla blóðfræðilegar og klínískar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst.

1.4.3.5. *Stórsæ krufning*

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrum í rannsókninni og skal m.a. rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá lifur, nýrum, nýrnahettum, eistum, eistalyppum, hóstarkirtli, milta, heila og hjarta allra dýranna, eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna.

Eftirfarandi vefir skulu varðveittir í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefjar og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili (helstu svæði, þ.m.t. stórheili, litli heili og heilabrú), mæna, magi, smáþarmar og digurgirni (þ.m.t. safneitlingar í dausgörn (e. *Peyer's patches*)), lifur, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, hóstarkirtill, skjaldkirtill, barki og lungu (varðveitt með fyllingu af festiefni og síðan ídýfingu), kynkirtlar, aukalíffæri kynkerfis (t.d. leg og blöðruhálskirtill), þvagblaðra, eitlar (helst einn eitill nálægt inngjafarleiðinni og annar langt frá henni til að sýna altæk áhrif), úttaug (set- eða sköflungstaug), helst í námunda við vöðvann, og sneið af beinmerg (eða, að öðrum kosti, nýlegt beinmergssýni). Niðurstöður, bæði klínískar og aðrar, geta bent til þess að rannsaka þurfi fleiri vefi. Einnig skal varðveita öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri út frá þekktum eiginleikum prófunarefnisins.

1.4.3.6. *Vefjameinafræðileg rannsókn*

Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum úr öllum dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Þessar rannsóknir skulu einnig ná til dýra úr öllum öðrum skammtahópum ef meðferðartengdar breytingar koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í meðferðarhópunum.

2. **GÖGN**

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, tegund vefjaskemmda og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda.

Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri, tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðiaðferðir á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, vikulega eftir það og við lok prófunar.

Prófunarskilyrði:

— rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður, styrkinn sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar;

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

Niðurstöður:

— líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,

— fóðurát og vatnsdrykkja, ef við á,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þ.m.t. merki um eiturhrif;

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— mat á skynfæravirkni, gripstyrk og hreyfistarfsemi,

— blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,

— upplýsingar um líkamsþyngd við aflífun og þyngd líffæra,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður

4. **HEIMILDIR**

Þessi aðferð samsvarar OECD-viðmiðunarreglu 407 um prófanir.

B.8. EITURHRIF (INNÖNDUN) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Gagnlegt er að afla upplýsinga fyrir fram um agnastærðardreifingu efnisins, gufuþrýsting, bræðslumark, suðumark, blossamark og sprengifimi (ef við á).

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta (A-lið).

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta (B-lið).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrir hópar tilraunadýra eru látnir verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í stigskiptum styrkleikum í tiltekinn tíma daglega í 28 daga og er notaður einn styrkleiki fyrir hvern hóp. Ef burðarefni er notað til að auðveldara verði að ná fram hæfilegum styrk prófunarefnisins í andrúmsloftinu er rétt að nota samanburðarhóp sem fær eingöngu burðarefni. Dýrin eru athuguð daglega á skömmtunartímabilinu til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir tilraunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í tilskilinn fjölda hópa. Ef nauðsyn krefur má bæta hentugu burðarefni við prófunarefnið til að auðveldara verði að ná fram hæfilegum styrk prófunarefnisins í andrúmsloftinu. Ef burðarefni eða önnur íblöndunarefni eru notuð til að auðvelda skömmtun verður að vera fullvíst að þau valdi ekki eiturhrifum. Nota má rannsóknarsöguleg gögn ef við á.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

1.6.2.1. *Tilraunadýr*

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin nema vitað sé um frábendingar. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá viðeigandi meðalgildi.

1.6.2.2. *Fjöldi og kyn*

Hafa skal minnst 10 dýr (fimm kvendýr og fimm karldýr) í hverjum prófunarhópi. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Að auki má meðhöndla 10 dýra fylgihóp (fimm dýr af hvoru kyni) með mesta styrk í 28 daga og fylgjast með því í 14 daga eftir meðferð hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg eða síðkomin. Einnig er notaður fylgihópur með 10 samanburðardýrum (fimm af hvoru kyni).

1.6.2.3. *Váhrifastyrkur*

Ef burðarefni er notað þarf minnst þrjá styrkleika ásamt samanburðarhópi eða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni (í styrk sem samsvarar styrk burðarefnisins í stærsta skammtinum). Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Mesti styrkurinn ætti að valda eiturhrifum en fáum eða engum dauðsföllum. Minnsti styrkurinn á ekki að framkalla nein merki um eiturhrif. Ef til er nothæft mat á styrk váhrifa á menn skal minnsti styrkurinn vera yfir því gildi. Æskilegt er að millistyrkurinn framkalli minnstu merkjanlegu eiturhrifin. Ef millistyrkleikar eru fleiri en einn skal þeim dreift þannig að þeir framkalli stigskipt eiturhrif. Í hópum, sem fá litla eða meðalstóra skammta, og í samanburðarhópunum þarf dánarhlutfallið að vera lágt til að marktækt mat fáist á niðurstöðunum.

1.6.2.4. *Váhrifatímabil*

Lengd daglegs váhrifatíma ætti að vera sex klukkustundir en nauðsynlegt getur verið að nota aðrar tímalengdir til að uppfylla sértækar kröfur.

1.6.2.5. *Búnaður*

Dýrin skulu prófuð í innöndunarbúnaði sem er hannaður til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Ef notaður er klefi skal hanna hann þannig að ekki verði of þröngt um dýrin og þau nái að anda að sér sem mestu af prófunarefninu. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli prófunarklefans. Láta má dýrið verða fyrir váhrifum um munn og nef, um höfuð eingöngu, eða um allan líkamann með því að setja dýrið í einstaklingsklefa, fyrri aðferðirnar tvær halda upptöku prófunarefnisins eftir öðrum íkomuleiðum í lágmarki.

1.6.2.6. *Athugunartímabil*

Athuga skal tilraunadýrin daglega allan meðferðar- og afturbatatímann með tilliti til merkja um eiturhrif. Skrá skal dauðastund og hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa.

1.6.3. **Verkferli**

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu daglega fimm til sjö daga í viku í 28 daga. Dýrum í fylgihópum, sem ætlaðir eru til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í 14 daga í viðbót til að kanna hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg. Hitastiginu við prófunina skal haldið við 22 ± 3 °C.

Æskilegt er að rakastiginu sé haldið milli 30–70% en í ákveðnum tilvikum (t.d. við prófanir á sumum úðaefnum) getur það verið óframkvæmanlegt í raun. Með því að halda vægum undirþrýstingi í klefanum (≤ 5 mm af vatni) má koma í veg fyrir að prófunarefnið leki út í aðliggjandi svæði. Ekki skal gefa fóður eða vatn meðan á váhrifum stendur.

Nota skal kvikt (e. *dynamic*) innöndunarkerfi með viðeigandi greiningar- og stjórnbúnaði fyrir styrkinn. Til að ákvarða hæfilega váhrifastyrkleika er mælt með tilraunaprófun. Stilla skal loftstreymið til að tryggja einsleitar aðstæður í öllum váhrifaklefanum. Kerfið á að tryggja að stöðugar váhrifaaðstæður náist svo fljótt sem auðið er.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

a) Hraði loftstreymis skal mældur (samfellt).

b) Raunstyrkur prófunarefnisins skal mældur á öndunarsvæðinu. Styrkurinn á daglega váhrifa-tímabilinu má ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu. Við notkun sumra úðaefna getur þó verið ómögulegt að hafa slíka stjórn á styrknum og eru þá leyfð stærri frávik. Halda skal styrkleikum eins stöðugum og unnt er frá degi til dags alla rannsóknina. Agnastærð úðaefna skal greind a.m.k. einu sinni í viku fyrir hvern prófunarhóp.

c) Hiti og raki skal mældur, samfellt ef þess er kostur.

Á váhrifatímanum og eftir hann eru gerðar athuganir og þær skráðar kerfisbundið og skal halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Athuga skal öll dýrin daglega og skrá merki um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð, til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Dýrin skulu vigtuð vikulega. Einnig er mælt með því að fóðurát sé mælt vikulega. Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í rannsókninni til að tryggja að þeim fækki sem minnst, s.s. vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Í lok rannsóknartímabilsins eru öll eftirlifandi dýr aflífuð og krufin í meðferðarhópunum sem ekki eru fylgihópar. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikla þjáningu eða sársauka, skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

Eftirfarandi rannsóknir skal gera í lok prófunarinnar á öllum dýrunum, að samanburðardýrunum meðtöldum:

i) blóðfræðilegar rannsóknir, a.m.k. varðandi blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna og mælingu á storknunarhæfni,

ii. klíníska, lífefnafræðilegar blóðrannsóknir sem fela í sér a.m.k einn mæliþátt fyrir lifrar- og nýrnastarfsemi: alanínamínótransferasa í sermi (áður þekktur sem glútamínpýruvíntransamínasi), aspartatamínótransferasa í sermi (áður þekktur sem glútamínoxalóasetattransamínasi), köfnunarefni í þvagefni, albúmín, kreatínín í blóði, heildargallrauða og heildarprótín í sermi.

Aðrar mælingar, sem geta verið nauðsynlegar fyrir fullnægjandi eiturefnafræðilegt mat, eru m.a. mælingar á kalsíum, fosfór, klóríði, natríum, kalíum, glúkósa eftir föstu, lípíðgreining, mælingar á hormónum, sýru-/basajafnvægi, methemóglóbíni og kólínesterasavirkni.

Gera má fleiri klíníska, lífefnafræðilegar mælingar, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau eiturhrif sem koma fram.

1.6.3.1. *Stórsæ krufning*

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrum í rannsókninni. Blautvigta skal a.m.k. lifur, nýru, nýrnahettur, lungu og eistu eins fljótt og hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna. Líffæri og vefi (öndunarveg, lifur, nýru, milta, eistu, nýrnahettur, hjarta og öll líffæri þar sem vart verður stórsærra vefjaskemmda eða breytinga á stærð) skal varðveita í hentugum miðli til að gera megi frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir síðar. Lungun skulu fjarlægð í heilu lagi og vigtuð og meðhöndluð með hentugu festiefni til að tryggja að lungnabyggingin haldist.

1.6.3.2. *Vefjameinafræðileg rannsókn*

Gera skal vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum dýra í hópnum sem fékk mesta styrkinn og í samanburðarhópnum eða -hópunum. Líffæri og vefi, sem hafa skaddast af völdum stærsta skammtsins af prófunarefninu, skal rannsaka í öllum hópum sem fengu minni skammt. Ef notaðir eru fylgihópar skal gera vefjafræðilega rannsókn á þeim og leggja sérstaka áherslu á líffæri og vefi sem hafa sýnt merki um eiturhrif í hinum meðferðarhópunum.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar og fjöldi dýra með hverja tegund vefjaskemmda.

Meta skal allar framkomnar niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður, fóður, o.s.frv.,

— prófunarskilyrði.

Lýsing á váhrifabúnaði, þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til að framleiða úða, aðferð við loftstýringu, meðhöndlun á útblásturslofti og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og, eftir því sem við á, stöðugleika úðastyrkleika eða dreifingu agnastærðar.

Váhrifagögn:

Þessi gögn skulu sett í töflu þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram ef unnt er:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli loftsins),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) loftaflfræðilegt massamiðgildisþvermál (MMAD) og rúmfræðilegt staðalfrávik (GSD),

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og styrk,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum, núlláhrifagildi,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— gögn um fóður og líkamsþyngd,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna ef unnt er,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta (D-lið).

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta (E-lið).

B.9. **EITURHRIF (UM HÚÐ) VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA (28 DAGAR)**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta (A-lið).

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta (B-lið).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er borið daglega í stigskiptum skömmtum á húð tilraunadýra í nokkrum hópum, ein skammtastærð fyrir hvern hóp, í 28 daga. Dýrin eru athuguð daglega þann tíma sem borið er á þau til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa. Skömmu fyrir prófunina er feldurinn klipptur af hrygg tilraunadýranna. Einnig má raka hann af en það skal gera u.þ.b. 24 klukkustundum fyrir prófunina. Venjulega þarf að endurtaka klippingu eða rakstur u.þ.b. vikulega. Þegar feldur er klipptur eða rakaður af skal þess gætt að skaða ekki húðina. Fjarlægja skal feld af a.m.k. 10% af yfirborði skrokksins til að bera prófunarefnið á. Taka skal tillit til þyngdar dýrsins þegar ákveðið er hvaða svæði skal klippt eða rakað og hversu stórt það á að vera. Þegar prófuð eru föst efni, sem má dyfta ef við á, skal væta prófunarefnið nægilega með vatni, eða hentugu burðarefni sé þess þörf, til að tryggja góða snertingu við húðina. Fljótandi prófunarefni eru yfirleitt notuð óþynnt. Borið er á daglega fimm til sjö daga í viku.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

1.6.2.1. *Tilraunadýr*

Nota má fullvaxnar rottur, kanínur eða naggrísi. Nota má aðrar tegundir en færa þarf rök fyrir notkun þeirra.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá viðeigandi meðalgildi.

1.6.2.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst 10 dýr með heilbrigða húð (5 kvendýr og 5 karldýr) fyrir hverja skammtastærð. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Að auki má meðhöndla 10 dýra fylgihóp (fimm dýr af hvoru kyni) með stærsta skammti í 28 daga og fylgjast með því í 14 daga eftir meðferð hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg eða síðkomin. Einnig er notaður fylgihópur með 10 samanburðardýrum (fimm af hvoru kyni).

1.6.2.3. *Skammtastærðir*

Ef burðarefni er notað þarf minnst þrjár skammtastærðir ásamt samanburðarhópi eða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni. Váhrifatímabilið skal vera minnst sex klukkustundir á dag. Prófunarefnið skal borið á um svipað leyti á hverjum degi og skammturinn aðlagaður með reglulegu millibili (vikulega eða aðra hverja viku) til að þess að skammtastærðin haldist sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað til að auðvelda skammtagjöf skal það gefið samanburðarhópnum, sem fær eingöngu burðarefni, á sama hátt og meðferðarhópunum og í sama magni og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Stærsti skammturinn ætti að valda eiturhrifum en engum eða fáum dauðsföllum. Minnsti skammturinn ætti ekki að framkalla nein merki um eiturhrif. Ef til er nothæft mat á styrk váhrifa á menn skal minnsti styrkurinn vera yfir því gildi. Æskilegt er að milliskammtastærðin framkalli minnstu merkjanlegu eiturhrifin. Ef milliskammtar eru fleiri en einn skal þeim dreift þannig að þeir framkalli stigskipt eiturhrif. Í hópum, sem fá litla eða meðalstóra skammta, og í samanburðarhópunum þarf dánarhlutfallið að vera lágt til að marktækt mat fáist á niðurstöðunum.

Ef áburður prófunarefnisins veldur ákafri húðertingu skal minnka styrkleikana en það getur leitt til þess að dragi úr öðrum eiturhrifum eða þau hverfi í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Ef húðin hefur skaddast mjög getur enn fremur verið nauðsynlegt að stöðva rannsóknina og hefja nýja rannsókn með minni styrkleikum.

1.6.2.4. *Markprófun*

Ef engin eiturhrif koma fram í forrannsókn með skammtastærð sem er 1000 mg/kg eða stærri skammti sem er ákveðinn samkvæmt vitneskju um váhrifin sem menn geta orðið fyrir kunna frekari prófanir að teljast ónauðsynlegar.

1.6.2.5. *Athugunartímabil*

Athuga skal tilraunadýrin daglega með tilliti til merkja um eiturhrif. Skrá skal dauðastund og hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa.

1.6.3. **Verkferli**

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Dýrin eru meðhöndluð með prófunarefninu, helst sjö daga í viku, í 28 daga. Dýrum í fylgihópum, sem ætlaðir eru til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í 14 daga í viðbót til að kanna hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg. Váhrifatíminn skal vera minnst sex klukkustundir á dag.

Prófunarefnið skal borið jafnt á svæði sem er u.þ.b. 10% af heildaryfirborði líkamans. Þegar um er að ræða mjög eitruð efni má svæðið, sem borið er á, vera minna en þekja skal eins mikið af svæðinu og unnt er með sem þynnstu og jöfnustu lagi.

Meðan á váhrifum stendur er prófunarefninu haldið í snertingu við húðina með gisinni grisju og plástri sem veldur engri ertingu. Að auki skal búið svo um prófunarsvæðið að grisjan og prófunarefnið haldist á sínum stað og dýrin geti ekki innbyrt prófunarefnið. Hefta má dýrin til að koma í veg fyrir að þau innbyrði prófunarefnið en ekki er mælt með því að þeim sé haldið alveg hreyfingarlausum. Einnig má nota varnarkraga.

Í lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja leifar af prófunarefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hreinsa húðina á annan viðeigandi hátt.

Athuga skal öll dýrin daglega og skrá merki um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara. Athuganirnar skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins, miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Dýrin skulu vigtuð vikulega. Einnig er mælt með því að fóðurát sé mælt vikulega. Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í rannsóknninni til að tryggja að þeim fækki sem minnst, s.s. vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Í lok rannsóknartímabilsins eru öll eftirlifandi dýr aflífuð og krufin í meðferðarhópunum sem ekki eru fylgihópar. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikla þjáningu eða sársauka, skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

Eftirfarandi rannsóknir skal gera í lok prófunarinnar á öllum dýrunum, að samanburðardýrunum meðtöldum:

1) blóðfræðilegar rannsóknir, a.m.k. varðandi blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna og mælingu á storknunarhæfni,

2) klínískar, lífefnafræðilegar blóðrannsóknir sem fela í sér a.m.k einn mæliþátt fyrir lifrar- og nýrnastarfsemi: alanínamínótransferasa í sermi (áður þekktur sem glútamínpýruvíntransamínasi), aspartatamínótransferasa í sermi (áður þekktur sem glútamínoxalóasetattransamínasi), köfnunarefni í þvagefni, albúmín, kreatínín í blóði, heildarmagn gallrauða og heildarprótín í sermi.

Aðrar mælingar, sem geta verið nauðsynlegar fyrir fullnægjandi eiturefnafræðilegt mat, eru m.a. mælingar á kalsíum, fosfór, klóríði, natríum, kalíum, glúkósa eftir föstu, lípíðgreining, mælingar á hormónum, sýru-/basajafnvægi, methemóglóbíni og kólínesterasavirkni.

Gera má fleiri klínískar, lífefnafræðilegar mælingar, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau áhrif sem koma fram.

1.6.4. **Stórsæ krufning**

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrum í rannsókninni. Blautvigta skal a.m.k. lifur, nýru, nýrnahettur og eistu eins fljótt og hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna. Líffæri og vefi, þ.e. eðlilega og meðhöndlaða húð, lifur, nýru, milta, eistu, nýrnahettur, hjarta og marklíffæri (þ.e. þau líffæri þar sem vart verður stórsærra vefjaskemmda eða breytinga á stærð) skal varðveita í hentugum miðli til að gera megi frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir síðar.

1.6.5. **Vefjameinafræðileg rannsókn**

Gera skal vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum dýra í hópnum sem fékk stærsta skammtinn og í samanburðarhópnum. Líffæri og vefi, sem hafa skaddast af völdum stærsta skammtsins af prófunarefninu, skal rannsaka í öllum hópum sem fengu minni skammt. Gera skal vefjafræðilega rannsókn á dýrunum í fylgihópnum og leggja sérstaka áherslu á líffæri og vefi sem hafa sýnt merki um eiturhrif í hinum meðferðarhópunum.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar og fjöldi dýra með hverja tegund vefjaskemmda.

Meta skal allar framkomnar niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— upplýsingar um dýrin (tegund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður, fóður, o.s.frv.),

— prófunarskilyrði (þ.m.t. tegund umbúða: loftþéttar eða ekki loftþéttar),

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað) og styrkleikar,

— núlláhrifagildi, ef unnt er,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— eiturhrif eða önnur áhrif,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— gögn um fóður og líkamsþyngd,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna ef unnt er,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta (D-lið).

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta (E-lið).

B.10. STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í GLASI Á LITNINGABREYTINGUM Í SPENDÝRUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 473 um prófanir: prófun í glasi á litningabreytingum í spendýrum (1997).

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með prófun í glasi á litningabreytingum er að ganga úr skugga um hvort tiltekin efni eða annað valdi byggingarlegum litningabreytingum í ræktuðum spendýrafrumum (1.–3. heimild). Byggingarlegar breytingar geta verið tvenns konar, annars vegar litningsbreytingar og hins vegar litningsþráðarbreytingar. Þorri efnafræðilegra stökkbreytivalda kallar fram litningsþráðarbreytingar en litningabreytingar sjást líka. Aukin fjöllitnun getur bent til þess að íðefni búi yfir getu til að kalla fram breytingar á fjölda litninga. Þessi aðferð er hins vegar ekki ætluð fyrir mælingu á frávikum í fjölda og er að jafnaði ekki notuð í þeim tilgangi. Stökkbreytingar í litningum og tengdir atburðir eru orsök margra erfðasjúkdóma í mönnum og haldgóðar vísbendingar eru fyrir því að stökkbreytingar í litningum og tengdir atburðir, sem valda breytingum á æxlisgenum og æxlisbælandi genum í líkamsfrumum, komi við sögu við myndun krabbameins í mönnum og tilraunadýrum.

Prófunin í glasi á litningabreytingum fer ýmist fram á ræktum með skilgreindum frumulínum eða frumustofnum eða fyrsta stigs frumuræktum. Frumurnar, sem eru notaðar, eru valdar eftir vaxtarhæfni þeirra í ræktum, eftir stöðugleika kjarngerðarinnar, litningafjölda, fjölbreytileika litninga og því hve tíðar sjálfsprottnar litningabreytingar eru í þeim.

Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Efnaskiptavirkjunarkerfi af þessu tagi getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim skilyrðum sem ríkja í lífi hjá spendýrum. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem leiða myndu til jákvæðra niðurstaðna sem endurspegla ekki eðlislæga, stökkbreytandi getu en geta stafað af breytingum á sýrustigi, osmólalstyrk eða miklum frumueiturhrifum (4. og 5. heimild).

Þessi prófun er notuð við leit að efnum sem eru hugsanlega stökkbreytivaldar og krabbameinsvaldar hjá spendýrum. Mörg efnasambönd, sem gefa jákvæða niðurstöðu í þessari prófun, eru krabbameinsvaldar í spendýrum en það er hins vegar ekki fullkomin fylgni milli þessarar prófunar og krabbameinsvaldandi eiginleika. Fylgnin ræðst af því úr hvaða flokki íðefnið er og æ fleiri vísbendingar hafa komið fram sem benda til að þessi prófun greini ekki suma krabbameinsvalda vegna þess að svo virðist sem gangvirki verkunar þeirra séu önnur en beinar skemmdir á erfðaefninu.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að stakir litningsþræðir rofna eða þeir rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða þeir rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Innræn tvöföldun: ferli þar sem kjarninn gengur ekki inn í jafnskiptingarferlið eftir S-fasa DNA-eftirmyndunar heldur byrjar annan S-fasa. Út úr þessu koma litningar með 4, 8, 16, ... litningsþráðum.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur breidd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

Jafnskiptingarhlutfall (e. *mitotic index*): hlutfallið milli fjölda frumna í miðfasa og mælds heildarfjölda frumna í frumuhópi, vísbending um hve ör fjölgunin er í þessum frumuhópi.

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er í þeim frumum sem eru notaðar.

Fjöllitnun: margfeldi á fjölda einlitna litninga (n), að tvílitnun undanskilinni (þ.e. 3n, 4n o.s.frv.).

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun á miðfasa frumuskiptingar sem úrfellingar og bútar, breytingar innan litninga eða breytingar milli litninga.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Frumur í rækt eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Frumurnar eru meðhöndlaðar með miðfasastöðvandi efni (t.d. Colcemid® eða kolsisíni) með fyrir fram ákveðnu millibili eftir að þær hafa orðið fyrir váhrifum frá prófunarefninu, síðan eru þær heimtar og litaðar og frumur í miðfasa því næst skoðaðar í smásjá í leit að litningabreytingum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Frumur*

Nota má ýmiss konar frumulínur, frumustofna eða ræktir með fyrsta stigs frumum, þ.m.t. frumur úr mönnum, (t.d. trefjakímfrumur úr kínahamstri og eitilfrumur úr útæðablóði manna eða annarra spendýra).

1.4.1.2. *Æti og ræktunarskilyrði*

Nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (viðeigandi ræktunarílát, koltvísýringsstyrk, hitastig og raka) til að viðhalda frumum í rækt. Fylgjast skal reglulega með skilgreindum frumulínum og -stofnum til að ganga úr skugga um að litningafjöldi sé eðlilegur og stöðugur og að ekki sé um berfrymingasmit að ræða en ekki skal nota frumur með slíku smiti. Nauðsynlegt er að vita hver eðlileg lengd frumuhringsins er og hver ræktunarskilyrðin eru.

1.4.1.3. *Undirbúningur ræktа*

Skilgreindar frumulínur og -stofnar: frumum úr stofnræktum er fjölgað, sáð á ræktunaræti í hæfilegum þéttleika til að ræktirnar renni ekki saman áður en frumurnar eru heimtar og þeim haldið við 37 °C.

Eitilfrumur: heilblóð, meðhöndlað með storkuvara (t.d. heparíni), eða eitilfrumur, einangraðar úr heilbrigðum einstaklingum, er sett út í ræktunaræti sem inniheldur jafnskiptingarræsi (t.d. rauðkornakekki úr plöntum (e. *phytohaemagglutinin*) og ræktað við 37 °C.

1.4.1.4. *Efnaskiptavirkjun*

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Algengast er að nota kerfi með hvatberasneyddum frumusafa (S9) sem er með viðbættum hjálparþætti og er unninn úr lifrum nagdýra sem hafa verið meðhöndluð með ensímvirkjum, s.s.: Aroclor 1254 (6.–9. heimild) eða blöndu af fenóbarbítóni og ß–naftóflavóni (10.–12. heimild).

Hvatberasneyddi frumusafinn er venjulega notaður í styrk sem er frá 1–10% að rúmmálshlutfalli í síðasta prófunarmiðlinum. Ástand efnaskiptavirkjunarkerfis getur ráðist af því úr hvaða íðefnaflokki prófunarefnið er. Í sumum tilvikum getur hentað að nota hvatberasneydda frumusafann í meira en einum styrkleika.

Margvíslegar framfarir, m.a. tilkoma erfðabreyttra frumulína sem tjá sérhæfð, virkjandi ensím, kunna að verða þess valdandi að koma megi við innrænni virkjun. Færa skal vísindaleg rök fyrir vali á frumulínunum sem eru notaðar (t.d. með því að sýtókróm-P450-samsætuensím skipti máli fyrir efnaskipti prófunarefnisins).

1.4.1.5. *Undirbúningur prófunarefnis*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Fljótandi prófunarefni má setja beint út í prófunarkerfin og/eða þynna þau fyrir meðferðina. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Ekki má nota leysi eða burðarefni sem grunur leikur á að geti hvarfast við prófunarefnið og leysirinn eða burðarefnið má hvorki skerða lifun frumnanna né S9-virknina. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Ef prófuð eru efni sem eru óstöðug í vatni skulu notaðir lífrænir leysar án vatns. Unnt er að fjarlægja vatn með því nota sameindasíu.

1.4.2.2. *Váhrifastyrkleikar*

Þær viðmiðanir, sem líta skal til þegar mesti styrkur er ákveðinn, eru m.a. frumueiturhrif, leysni í prófunarkerfinu og breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk.

Frumueiturhrif skulu ákvörðuð með efnaskiptavirkjun og án hennar í aðaltilrauninni og þar skal styðjast við viðeigandi vísbendingar um heilleika og vöxt frumna, s.s. samrennsli frumna, líftölu frumna eða jafnskiptingarhlutfall. Heppilegt getur verið að ákvarða frumueiturhrif og leysni í fortilraun.

Nota skal a.m.k. þrjá greiningarbæra styrkleika. Ef frumueiturhrifa gætir skal haga þessum styrkleikum þannig að eiturhrifin verði allt frá því að vera í hámarki og niður í það að vera lítil eða engin. Að öllu jöfnu merkir þetta að munurinn á styrkleikum skal ekki vera meiri en sem nemur stuðli frá 2 og upp í $\sqrt{10}$. Þegar kemur að heimtum skal samrennsli, líftala frumna eða jafnskiptingarhlutfall hafa minnkað verulega (allir þættirnir um meira en 50%) við mesta styrkleika. Jafnskiptingarhlutfallið er einungis óbeinn mælikvarði á frumueiturhrif eða frumuhamlandi áhrif og er háð tímanum sem er liðinn frá meðhöndluninni. Jafnskiptingarhlutfallið er á hinn bóginn nothæft þegar um svifblöndurækt er að ræða þar sem erfitt getur verið að nota annars konar mælikvarða fyrir eiturhrif eða þeir henta ekki. Upplýsingar um hraða frumuhringsins, s.s. meðalkynslóðartíma, geta nýst sem ítarupplýsingar. Meðalkynslóðartími er hins vegar heildarmeðaltal sem sýnir ekki alltaf tilvist síðkominna undirþýða og jafnvel lítils háttar aukning á meðalkynslóðartíma getur leitt til þess að ákjósanlegasti fjöldi breytinga næst mun síðar en ella hefði orðið.

Þegar um er að ræða efni með tiltölulega litla frumudrepandi verkun skal hámarksprófunarstyrkur vera 5 µl/ml, 5 mg/ml eða 0,01 M, eftir því hvert gildanna er lægst.

Þegar um er að ræða tiltölulega lítt leysanleg efni sem eru ekki eitruð þegar styrkur þeirra er undir leysanleikamörkum skal stærsti skammturinn, sem notaður er, vera yfir leysanleikamörkunum í endanlega ræktunaræti þegar meðferðinni lýkur. Í sumum tilvikum (t.d. þegar frumueiturhrif koma eingöngu fram við styrk sem er yfir lægstu leysanleikamörkum) er ráðlegt að prófun fari fram með fleiri en einum styrkleika þar sem útfelling er sjáanleg. Gagnlegt getur verið að meta leysnina í upphafi meðhöndlunar og við lok hennar þar eð leysnin getur breyst meðan váhrifa gætir í prófunarkerfinu vegna nærveru frumna, S9, blóðvatns o.s.frv. Unnt er að staðfesta óleysanleika með berum augum. Útfellingin má ekki hafa áhrif á matið (e. *scoring*).

1.4.2.3. *Neikvæður og jákvæður samanburður*

Í hverri tilraun skal vera samskeiða, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Þegar efnaskiptavirkjun er viðhöfð skal íðefnið í jákvæða samanburðinum vera það efni sem krefst virkjunar til að kalla fram stökkbreytandi svörun.

Í jákvæða samanburðinum skal nota efni sem vitað er að veldur litningaskemmdum (e. *clastogen*) þegar það er gefið í styrkleika sem vænst er að valdi samanburðarnákvæmri og greinanlegri aukningu miðað við bakgrunnsgildið en það sýnir fram á næmi prófunarkerfisins.

Velja skal styrkleika fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að sá sem les af geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnisglerin. Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Efnaskiptavirkjun	Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
Engin útræn efnaskiptavirkjun	metýlmetansúlfónat	66-27-3	200-625-0
	etýlmetansúlfónat	62-50-0	200-536-7
	etýlnítrósóúrea	759-73-9	212-072-2
	mítómýsín C	50-07-7	200-008-6
	4-nítrókínólín-N-oxíð	56-57-5	200-281-1
Útræn efnaskiptavirkjun	bensó(a)pýren	50-32-8	200-028-5
	sýklófosfamíð sýklófosfamíðmónóhýdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Nota má önnur viðeigandi efni við jákvæðan samanburð. Kanna skal hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, ef þau eru tiltæk.

Í hvert sinn sem frumur eru heimtar skal hafa neikvæðan samanburð sem byggist á því að meðhöndlunarmiðillinn er eingöngu leysir eða burðarefni sem fær sömu meðhöndlun og ræktirnar. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, hafi hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

1.4.3. **Verkferli**

1.4.3.1. *Meðhöndlun með prófunarefninu*

Frumur, sem eru í fjölgunarferli, skulu meðhöndlaðar með prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Meðhöndlun eitilfrumna skal hefjast um 48 klukkustundum eftir örvun jafnskiptingar.

1.4.3.2. Að öllu jöfnu skal nota tvær ræktir fyrir hvern styrkleika og einnig er mælt sterklega með þeirri tilhögun fyrir neikvæðar samanburðarræktir (samanburður með leysi). Ef unnt er, á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna, að sýna fram á að munur á tveimur samhliða ræktunum sé hverfandi (13. og 14. heimild) er ásættanlegt að nota eina rækt fyrir hvern styrkleika.

Loftkennd eða rokgjörn efni skulu prófuð með viðeigandi aðferðum, t.d. í lokuðum ræktunarílátum (15. og 16. heimild).

1.4.3.3. *Heimtur úr rækt*

Í fyrstu tilrauninni skulu frumur látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með og án efnaskiptavirkjunar, í þrjár til sex klukkustundir og sýni tekið úr þeim eftir að tími, sem jafngildir lengd eins og hálfs eðlilegs frumuhrings, er liðinn frá upphafi meðhöndlunar (12. heimild). Verði niðurstaðan samkvæmt þessari aðferðarlýsingu neikvæð, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar, skal gera aðra tilraun án virkjunar og nú með samfelldri meðhöndlun þar til sýni eru tekin að loknum tíma sem svarar til eins og hálfs eðlilegs frumuhrings. Sum íðefni greinast frekar ef tíminn fram að meðhöndlun eða sýnatöku er lengri en sem nemur einum og hálfum frumuhring. Ef niðurstöður með efnaskiptavirkjun eru neikvæðar þarf að staðfesta þær í hverju tilviki um sig. Sé ekki talin þörf á því að staðfesta neikvæðar niðurstöður skal færa rök fyrir því.

1.4.3.4. *Undirbúningur á litningum*

Frumuræktir eru meðhöndlaðar með Colcemid® eða kolsisíni, venjulega í eina til þrjár klukkustundir, áður en þær eru heimtar. Hver frumurækt er heimt og meðhöndluð sérstaklega þegar kemur að undirbúningi litninga. Undirbúningur á litningum er fólginn í meðhöndlun frumnanna í undirþrýstinni lausn og festingu og litun.

1.4.3.5. *Greining*

Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæð og neikvæð samanburðarsýni, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu. Þar eð festingarferlið leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa rofnar og þær tapa við það litningum skal þess gætt að fjöldi þráðhafta í þeim frumum, sem eru metnar, sé algengasta gildi ± 2 fyrir allar frumugerðir. Fyrir hvern styrkleika og samanburð skal meta a.m.k. 200 frumur sem eru í vel dreifðum miðfasa og ef ræktirnar eru tvær skulu þær skiptast jafnt á milli þeirra. Fjöldinn má vera minni ef margar breytingar greinast.

Þótt tilgangur prófunarinnar sé að greina byggingarlegar breytingar í litningum er mikilvægt að skrá fjöllitnun og innræna tvöföldun þegar slíkra breytinga verður vart.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Fruman er tilraunaeiningin og því skal meta hundraðshluta frumna með byggingarlegar litningabreytingar. Skrá skal mismunandi tegundir byggingarlegra litningabreytinga og tilgreina fjölda þeirra og tíðni í tilrauna- og samanburðarræktum. Skörð skulu skráð sérstaklega og gera skal grein fyrir þeim en þau skulu að jafnaði ekki tekin með í reikningum á heildartíðni breytinga.

Enn fremur skal í aðaltilraununum, sem varða litningabreytingar, skrá samskeiða mælingar á frumueiturhrifum fyrir allar meðhöndlaðar og neikvæðar samanburðarræktir.

Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri svörun. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum. Fjallað var um nauðsyn þess að staðfesta neikvæðar niðurstöður í lið 1.4.3.3 hér að framan. Í eftirfylgnitilraunum skal vega og meta hvort breyta skuli mæliþáttum rannsóknarinnar til að víkka svið tilraunaskilyrðanna sem matið tekur til. Meðal þátta í rannsókninni, sem kemur til álita að breyta, er bilið milli skammtastyrkleika og skilyrðin við efnaskiptavirkjunina.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. styrktengd aukning eða samanburðarnákvæm aukning á fjölda frumna með litningabreytingar. Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum (3. og 13. heimild). Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð.

Ef fjöllitna frumum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunarefnið geti hugsanlega hamlað jafnskiptingarferlunum og stuðlað að breytingum á litningafjölda. Ef frumum með innræna tvöföldun í litningum fjölgar getur það verið vísbending um að prófunarefnið geti hugsanlega stöðvað framrás frumuhringsins (17. og 18. heimild).

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessu kerfi.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður úr litningabreytingaprófunum í glasi benda til þess að prófunarefnið kalli fram byggingarlegar litningabreytingar í ræktuðum líkamsfrumum spendýra. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram litningabreytingar í ræktuðum líkamsfrumum spendýra.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Frumur:

— gerð og uppruni frumna,

— einkenni kjarngerðarinnar og hæfi þeirrar frumugerðar sem er notuð,

— upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum, ef við á,

— upplýsingar um lengd frumuhrings,

— kyn blóðgjafa, heilblóð eða einangraðar eitilfrumur og jafnskiptingarræsirinn sem er notaður,

— umsáningartala, ef við á,

— aðferðir til að viðhalda frumurækt, ef við á,

— eðlilegur fjöldi litninga.

Prófunarskilyrði:

— auðkenni miðfasastöðvandi efnis, styrkur þess og hversu lengi frumur eru látnar verða fyrir váhrifum frá því,

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda ræktа sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni, ef við á.

— samsetning ræktunarætis og, ef við á, koltvísýringsstyrkur,

— styrkur prófunarefnisins,

— rúmmál burðarefnis og prófunarefnis sem er bætt við,

— ræktunarhiti,

— ræktunartími,

— lengd meðferðartíma,

— frumuþéttleiki við sáningu, ef við á,

— tegund og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfis, m.a. viðmiðanir fyrir ásættanleika,

— jákvæður og neikvæður samanburður,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— viðmiðanir fyrir mat á breytingum í litningum,

— fjöldi frumna í miðfasa sem eru skoðaðar,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif, t.d. hve mikið er um samrennsli, gögn um frumuhring, líftala frumna, jafnskiptingarhlutfall,

— merki um útfellingu,

— gögn um sýrustig og osmólalstyrk í meðhöndlunarmiðlinum, ef þessir þættir eru mældir,

— skilgreining á breytingum í litningum, m.a. á skörðum,

— fjöldi frumna með litningabreytingum og tegund litningabreytinga, tilgreint sérstaklega fyrir hverja meðhöndlaða rækt og samanburðarrækt,

— breytingar á litnun, komi þær fram,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef um þær er að ræða,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Evans, H. J., (1976) Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, bls. 1-29.

2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T., (1985). The In Vitro Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, bls. 427-432.

3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E., (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. Environs. Molec. Mutagen 10 (suppl. 10), bls. 1-175.

4) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991) Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res, 257, bls.. 147-204.

5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, bls. 297-305.

6) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, bls. 347-364.

7) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, bls. 173-215.

8) Natarajan, A.T., Tates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N., (1976) Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System in Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, bls. 83-90.

9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr., (1979) Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro. Mutation Res., 66, bls. 277-290.

10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 175-177.

11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, bls. 85-88.

12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T., (1994) Report from Working Group on in In Vitro Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312, bls. 241-261.

13) Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B., (1989) Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. Í: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, bls. 141-154.

14) Soper, K.A. and Galloway, S.M., (1994) Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. Mutation Res., 312, bls. 139-149.

15) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T., (1982) CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, bls. 91-103.

16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L., (1983) Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, bls. 795-801.

17) Locke-Huhle, C., (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res., 119, bls. 403-413.

18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E., (1983) Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, bls. 1362-1364.

B.11. STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í LÍFI Á LITNINGABREYTINGUM Í BEINMERG SPENDÝRA

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 475 um prófanir: prófun á litningabreytingum í beinmergsfrumum spendýra (1997).

1.1. INNGANGUR

Prófun í glasi á litningabreytingum í spendýrafrumum er notuð til að greina byggingarlegar litningabreytingar sem prófunarefni kallar fram í beinmergsfrumum hjá dýrum, yfirleitt hjá nagdýrum (1.–4. heimild). Byggingarlegar litningabreytingar geta verið tvenns konar, annars vegar litningabreytingar og hins vegar litningsþráðarbreytingar. Aukin fjöllitnun getur bent til þess að íðefni búi yfir getu til að kalla fram breytingar á fjölda litninga. Þorri efnafræðilegra stökkbreytivalda kallar fram litningsþráðarbreytingar en litningabreytingar sjást líka. Stökkbreytingar í litningum og tengdir atburðir eru orsök margra erfðasjúkdóma í mönnum og haldgóðar vísbendingar eru um að stökkbreytingar í litningum og tengdir atburðir, sem valda breytingum á æxlisgenum og æxlisbælandi genum í líkamsfrumum, komi við sögu við myndun krabbameins í mönnum og tilraunadýrum.

Nagdýr eru venjulega notuð til þessarar prófunar. Markvefurinn í þessari prófun er beinmergur þar eð hann er mjög æðaríkur vefur og í honum eru frumur sem fjölga sér ört og auðvelt er að einangra þær og meðhöndla. Þessi aðferð er ekki notuð fyrir aðrar tegundir dýra eða aðra markvefi.

Þessi prófun á litningabreytingu hentar einkum til þess að meta hættu á stökkbreytingum þar eð hún gefur kost á að taka til skoðunar þætti úr efnaskiptum í lífi, lyfjahvörf og viðgerðarferli DNA þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum og vefjum. Prófun í lífi er einnig gagnleg til frekari rannsóknar á stökkbreytandi áhrifum sem koma fram við prófun í glasi.

Þessi prófun hentar ekki ef rök eru fyrir því að prófunarefnið, eða hvarfgjarnt umbrotsefni þess, nái ekki út í markvefinn.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að stakir litningsþræðir rofna eða þeir rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða þeir rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Innræn tvöföldun: ferli þar sem kjarninn gengur ekki inn í jafnskiptingarferlið eftir S-fasa DNA-eftirmyndunar heldur byrjar annan S-fasa. Út úr þessu koma litningar með 4, 8, 16, ... litningsþráðum.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur breidd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er í þeim frumum sem eru notaðar.

Fjöllitnun: margfeldi á fjölda einlitna litninga (n), að tvílitnun undanskilinni (þ.e. 3n, 4n o.s.frv.).

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun á miðfasa frumuskiptingar sem úrfellingar og bútar, breytingar innan litninga eða breytingar milli litninga.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og eru síðan aflífuð þegar meðferðin hefur staðið hæfilega lengi. Áður en dýrin eru aflífuð eru þau meðhöndluð með miðfasastöðvandi efni (t.d. Colcemid® eða kolsisíni). Litningasýni eru því næst útbúin úr beinmergsfrumum og lituð og frumur í miðfasa eru síðan skoðaðar í leit að litningabreytingum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Algengt er að nota rottur, mýs eða kínahamstra en einnig má nota aðrar heppilegar tegundir spendýra. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.4.1.2. *Aðbúnaður og fóðrun*

Almennu skilyrðin, sem eru tilgreind í almenna inngangínum að B-hluta, gilda en þó ætti að leitast við að halda rakanum við 50–60%.

1.4.1.3. *Undirbúningur dýra*

Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt. Dýrin skulu látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga.

1.4.1.4. *Tilreiðsla skammta*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru gefin dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunarefni óblönduð eða þynnt. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunarefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni.

1.4.2.2. *Samanburður*

Í hverri prófun skal vera samskeiða, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður fyrir hvort kyn. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu.

Efni, sem eru notuð í jákvæðum samanburði, ættu að framkalla byggingarlegar breytingar í lífi þegar þau eru gefin í styrkleika sem vænst er að valdi greinanlegri aukningu umfram það sem gerist við bakgrunnsgildi. Velja skal skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að sá sem les af geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnisglerin. Það er ásættanlegt að íkomuleið fyrir jákvæða samanburðinn sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunarefnið og að sýni séu tekin aðeins í eitt skipti. Ef íðefni úr sama flokki og prófunarefnið eru tiltæk kemur til greina að nota þau við jákvæðan samanburð. Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
etýlmetansúlfónat	62-50-0	200-536-7
etýlnítrósóúrea	759-73-9	212-072-2
mítómýsín C	50-07-7	200-008-6
sýklófosfamíð sýklófosfamíðmónóhýdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
tríetýlenmelamín	51-18-3	200-083-5

Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp sem er meðhöndlaður einvörðungu með leysi eða burðarefni en að öðru leyti meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem staðfesta að viðunandi breytileiki sé milli dýra og að hlutfall frumna með litningabreytingar sé viðunandi. Ef sýnataka úr neikvæðum samanburðarhópum fer fram aðeins einu sinni er heppilegast að hún fari fram við fyrstu sýnatökuna. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg eða birt samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn eða burðarefnið, sem valið hefur verið, framkalli hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Í hverjum meðferðarhópi og hverjum samanburðarhópi skulu vera a.m.k. fimm greiningarbær dýr af hvoru kyni. Ef gögn liggja fyrir, þegar rannsóknin er gerð, úr rannsóknum á sömu dýrategund og með sömu váhrifaleið og gögnin sýna að enginn umtalsverður munur er á eiturhrifum eftir kyni þá nægir að prófunin fari fram á dýrum af öðru kyninu. Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni dýrsins sem við á hverju sinni.

1.5.2. **Meðferðaráætlun**

Æskilegt er að gefa prófunarefnin í einni meðferð. Prófunarefni má þó einnig gefa í tveimur áföngum, þ.e. meðferðin skiptist í tvær gjafir á sama degi og skulu ekki líða nema fáeinar klukkustundir á milli en þannig er auðveldara að gefa mikið rúmmál efnis. Ef skömmtun er með öðrum hætti skal færa vísindaleg rök fyrir því.

Sýni skulu tekin á tveimur mismunandi tímum eftir eins dags meðferð. Ef um nagdýr er að ræða skal fyrri sýnatakan eiga sér stað að liðnum hálfum öðrum eðlilegum frumuhring (sem að öllu jöfnu er 12–18 klukkustundir) frá meðferð. Þar eð besti tíminn til að greina litningabreytingar er hugsanlega kominn undir því hve langan tíma upptaka og efnaskipti prófunarefnisins taka og hvaða áhrif prófunarefnið hefur á hraða frumuhringsins er mælt með því sýni séu tekin aftur 24 klukkustundum eftir að fyrri sýnin voru tekin. Ef skömmtun nær yfir lengri tíma en einn dag skal taka sýni einu sinni að liðnum hálfum öðrum frumuhring frá lokameðferð.

Áður en dýrin eru aflífuð er hæfilegum skammti af miðfasastöðvandi efni (t.d. Colcemid® eða kolsisíni) sprautað í kviðarhol þeirra. Eftir það eru sýni tekin úr dýrunum með hæfilegu millibili. Fyrir mýs er þetta millibil u.þ.b. 3–5 klukkustundir en fyrir kínahamstra er millibilið u.þ.b. 4–5 klukkustundir. Frumur eru heimtar úr beinmerg og skoðaðar í leit að litningabreytingum.

1.5.3. **Skammtastærðir**

Ef engin nothæf gögn liggja fyrir og framkvæma þarf skammtastærðarannsókn skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni og kyni tilraunadýra og í meginrannsókninni og meðferðaráætlunin skal vera hin sama í báðum tilvikum (5. heimild). Ef um eiturhrif er að ræða skal nota þrjár skammtastærðir áður en sýni eru tekin í fyrsta sinn. Þessum skammtastærðum skal hagað þannig að eiturhrifin verði allt frá því að vera í hámarki og niður í það að vera lítil eða engin. Þegar sýni eru tekin síðar nægir að nota eingöngu stærsta skammtinn. Stærsti skammturinn er skilgreindur sem sá skammtur sem kallar fram þannig merki um eiturhrif að búast megi við því, miðað við óbreytta skömmtunaráætlun, að stærri skammtar valdi dauða. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða efni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmtum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og jafnskiptingarræsar) og þau skulu metin hvert um sig. Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í beinmerg (t.d. ef jafnskiptingarhlutfall minnkar um meira en 50%).

1.5.4. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar og er gefin í einum áfanga eða í tveimur áföngum á sama degi og ef erfðaeiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Þegar um er að ræða lengri rannsóknir er viðmiðunar-skammturinn 2000 mg/kg/líkamsþyngdar/dag fyrir allt að 14 daga meðferð og 1000 mg/kg/líkamsþyngdar/dag fyrir meðferð sem varir lengur en í 14 daga. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta í markprófuninni.

1.5.5. **Gjöf skammta**

Dýrunum er yfirleitt gefið prófunarefnið í maga með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu eða efninu er sprautað í kviðarhol. Gefa má efnið eftir öðrum leiðum en þá skal það stutt rökum. Það ræðst af stærð tilraunadýrsins hve mikinn vökva hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun. Rúmmálið skal ekki vera meira en 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Færa skal rök fyrir því ef rúmmálið er meira

en þetta. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun meiri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

1.5.6. **Undirbúningur litninga**

Beinmergurinn er tekinn strax eftir aflífun dýranna, settur í undirþrýstna lausn og festur. Frumunum er síðan strokið á sýnisgler og þær litaðar.

1.5.7. **Greining**

Jafnskiptingarhlutfallið er mælikvarði á frumueiturhrif og skal ákvarðað í a.m.k. 1000 frumum á dýr fyrir hvert dýr sem hefur fengið meðferð (þ.m.t. jákvæð samanburðardýr) og ómeðhöndluð dýr í neikvæða samanburðarhópnum.

Hið minnsta 100 frumur skulu greindar fyrir hvert dýr. Fjöldinn má vera minni ef margar breytingar greinast. Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæð og neikvæð samanburðarsýni, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu. Þar eð undirbúningur sýnisglerja leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa rofnar og þær tapa við það litningum skal þess gætt að fjöldi þráðhafta í þeim frumum, sem eru metnar, sé 2n ± 2.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Tilraunaeiningin er eitt dýr. Fyrir hvert dýr skal tilgreina fjölda metinna frumna, fjölda breytinga fyrir hverja frumu og hundraðshluta frumna með einni eða fleiri byggingarlegum litningabreytingum. Skrá skal mismunandi tegundir byggingarlegra litningsbreytinga og tilgreina fjölda þeirra og tíðni í meðferðar- og samanburðarhópunum. Skörð skulu skráð sérstaklega og gera skal grein fyrir þeim en þau skulu að jafnaði ekki tekin með í reikningum á heildartíðni breytinga. Ef engar vísbendingar eru um mismunandi svörun eftir kyni dýra er heimilt að sameina gögn fyrir bæði kynin til tölfræðilegrar greiningar.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. skammtatengd aukning á hlutfallslegum fjölda frumna með litningabreytingum eða ótvíræð aukning á fjölda frumna með litningabreytingum sem kemur fram við eina sýnatöku hjá hópi sem fær stakan skammt. Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum (6. heimild). Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum.

Aukin fjöllitnun getur bent til þess að prófunarefnið búi yfir getu til að kalla fram breytingar á fjölda litninga. Aukning í innrænni tvöföldun getur bent til þess að prófunarefnið geti hugsanlega stöðvað framrás frumuhringsins (7. og 8. heimild).

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessari prófun.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er gerð.

Jákvæðar niðurstöður úr litningabreytingaprófunum í lífi benda til þess að prófunarefnið kalli fram litningabreytingar í beinmerg þeirrar dýrategundar sem er notuð í prófuninni. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram litningabreytingar í beinmergsfrumum þeirrar dýrategundar sem er notuð í prófuninni.

Fjalla skal um líkindi þess að prófunarefnið eða umbrotsefni þess nái út í almennu blóðrásina og þó einkum markvefinn (t.d. altæk eiturhrif).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik líkamsþyngdar fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— jákvæður og neikvæður (burðarefni/leysir) samanburður,

— gögn úr skammtastærðarrannsókn hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— rökstuðningur fyrir vali á íkomuleið,

— aðferðir til að sannreyna að prófunarefnið hafi náð út í almennu blóðrásina eða markvefinn, ef við á,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— ítarleg lýsing á áætlunum um meðferð og sýnatöku,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— auðkenni miðfasastöðvandi efnis, styrkur þess og hversu lengi meðferð stendur,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— viðmiðanir fyrir mat á breytingum í litningum,

— fjöldi frumna sem eru skoðaðar úr hverju dýri,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif,

— jafnskiptingarhlutfall,

— tegund og fjöldi breytinga, tilgreint sérstaklega fyrir hvert dýr,

— heildarfjöldi breytinga fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfráviki,

— heildarfjöldi frumna með breytingum fyrir hvern hóp ásamt meðaltali og staðalfráviki,

— breytingar á litnun, komi þær fram,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef um þær er að ræða,

— gögn um samskeiða, neikvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— gögn um samskeiða, jákvæðan samanburð.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Adler, I.D., (1984) Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., bls. 275-306.

2) Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. Mutation Res., 189, bls. 157-165.

3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L., (1990) In Vivo Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 115-141.

4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B., (1994) Report from the Working Group on the In Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. Mutation Res., 312, bls. 305-312.

5) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 313-319.

6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. bls. 184-232.

7) Locke-Huhle, C., (1983) Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. Mutation Res. 119, bls. 403-413.

8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E., (1983) Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, bls. 1362-1364.

B.12. STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í LÍFI Á SMÁKJÖRNUM RAUÐKORNA HJÁ SPENDÝRUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 474 um prófanir: prófun í lífi á smákjörnum rauðkorna hjá spendýrum (1997).

1.1. INNGANGUR

Prófun í lífi á smákjörnum hjá spendýrum er notuð til að greina skemmdir, sem prófunarefni veldur á litningum eða jafnskiptingarkerfum rauðkornamæðra, með því að skoða rauðkorn í sýnum úr beinmerg og/eða blóðfrumur úr útæðakerfi dýra, yfirleitt nagdýra.

Tilgangur smákjarnaprófunarinnar er að sanngreina efni sem valda frumuerfðafræðilegum skaða þannig að til verða smákjarnar með eftirliggjandi litningabrotum eða heilum litningum.

Þegar rauðkornamóðir í beinmerg þroskast í fjöllita rauðkorn þrýstist meginkjarninn út og hafi smákjarni myndast í frumunni getur hann orðið eftir í annars kjarnalausu umfrymi. Í þessum frumum er enginn meginkjarni og fyrir vikið er auðveldara að greina smákjarnana. Ef fjöllita, smákjörnótt rauðkorn eru fleiri í dýrum, sem hafa fengið meðferð, en venja er til er það vísbending um framkallaðan skaða í litningum.

Í þessari prófun er venjulega notaður beinmergur úr nagdýrum þar eð fjöllita rauðkorn myndast í þeim vef. Einnig má taka gildar mælingar á smákjörnóttum, óþroskuðum (fjöllita) rauðkornum í útæðablóði hjá öðrum tegundum ef sýnt hefur verið fram á að miltað í dýrunum sé ófært um að fjarlægja smákjörnótt rauðkorn eða að dýr af þessum tegundum séu svo næm að þau nýtist til að greina efni sem orsaka byggingarlegar litningabreytingar eða breytingar á litningafjölda. Greina má milli mismunandi smákjarna með margs konar viðmiðunum. Meðal annars með því að sanngreina hvort þráðhald eða þráðhaft sé í smákjörnunum eða ekki. Mikilvægasti endapunkturinn er hlutfall smákjörnóttra, óþroskaðra (fjöllita) rauðkorna. Einnig má nota fjölda þroskaðra (hóflitaðra (e. *normochromatic*)), smákjörnóttra rauðkorna í útæðablóði innan um tiltekinn fjölda þroskaðra rauðkorna sem endapunkt í greiningunni ef dýrin eru í stöðugri meðferð í fjórar vikur eða lengur.

Þessi smákjarnaprófun í lífi á spendýrum hentar einkum til þess að meta hættu á stökkbreytingum þar eð hún gefur kost á að taka til skoðunar þætti úr efnaskiptum í lífi, lyfjahvörf og viðgerðarferli DNA þótt þessir þættir séu hugsanlega breytilegir eftir dýrategundum og vefjum og eftir erfðafræðilegum endapunktum. Prófun í lífi er einnig gagnleg til frekari rannsóknar á stökkbreytandi áhrifum sem koma fram við prófun í glasi.

Þessi prófun hentar ekki ef rök eru fyrir því að prófunarefnið, eða hvarfgjarnt umbrotsefni þess, nái ekki út í markvefinn.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Þráðhaft (þráðhald): svæði á litningi þar sem spóluþræðir festast meðan á frumuskiptingu stendur en það gerir dótturlitningunum kleift að færast skipulega að skautum dótturfrumnanna.

Smákjörnungar: smágerðir aukakjarnar sem eru aðskildir frá meginkjörnum frumnanna og verða til í lokafasa jafnskiptingar (e. *mitosis*) (í rýriskiptingu (e. *meiosis*)) um eftirliggjandi litningabrot eða heila litninga.

Hóflituð rauðkorn: þroskuð rauðkorn, án ríbósóma, sem þekkjast frá óþroskuðum, fjöllita rauðkornum þegar þau eru lituð með sérstökum litum fyrir ríbósóm.

Fjöllita rauðkorn: óþroskuð rauðkorn á millistigi í þroskun sem eru enn með ríbósóm og þekkjast því frá þroskuðum, hóflituðum rauðkornum þegar þau eru lituð með sérstökum litum fyrir ríbósóm.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu á viðeigandi hátt. Ef beinmergur er notaður til greiningar eru dýrin aflífuð þegar hæfilegur tími er liðinn frá meðferðinni og síðan er beinmergurinn tekinn og sýni útbúin og lituð (1.–7. heimild). Ef útæðablóð er notað til greiningar er blóð tekið þegar hæfilegur tími er liðinn frá meðferðinni og síðan eru stroksýni útbúin og lituð (4., 8., 9. og 10. heimild). Í rannsóknum á útæðablóði skal heimta frumur eins fljótt og auðið er að síðustu váhrifum loknum. Sýni eru skoðuð í leit að smákjörnum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Mælt er með því að nota mýs eða rottur ef beinmergur er skoðaður en einnig má nota aðrar heppilegar tegundir spendýra. Æskilegt er að velja mýs ef útæðablóð er notað. Á hinn bóginn má nota aðrar heppilegar tegundir spendýra, að því tilskildu að um sé að ræða tegund dýra þar sem miltað fjarlægir ekki smákjörnótt rauðkorn eða ef sýnt þykir að dýr af þessum tegundum séu svo næm að þau nýtist til að greina efni sem orsaka byggingarlegar litningabreytingar eða breytingar á litningafjölda. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.4.1.2. *Aðbúnaður og fóðrun*

Almennu skilyrðin, sem eru tilgreind í almenna inngangínum að B-hluta, gilda en þó ætti að leitast við að halda rakanum við 50–60%.

1.4.1.3. *Undirbúningur dýra*

Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt. Dýrin skulu látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif.

1.4.1.4. *Tilreiðsla skammta*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru gefin dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunarefni óblönduð eða þynnt. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunarefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni.

1.4.2.2. *Samanburður*

Í hverri prófun skal vera samskeiða, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður fyrir hvort kyn. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu.

Efni, sem eru notuð í jákvæðum samanburði, ættu að framkalla smákjarna í lífi þegar þau eru gefin í styrkleika sem vænst er að valdi greinanlegri aukningu umfram það sem gerist við bakgrunnsgildi. Velja skal skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að sá sem les af geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnisglerin. Það er ásættanlegt að íkomuleið fyrir jákvæða samanburðinn sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunarefnið og að sýni séu tekin aðeins í eitt skipti. Auk þess má kanna hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, ef þau eru tiltæk. Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
etýlmetansúlfónat	62-50-0	200-536-7
N-etýl-N-nítrósóúrea	759-73-9	212-072-2
mítómýsín C	50-07-7	200-008-6
sýklófosfamíð sýklófosfamíðmónóhýdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
tríetýlenmelamín	51-18-3	200-083-5

Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp sem er meðhöndlaður einvörðungu með leysi eða burðarefni en að öðru leyti meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem staðfesta að viðunandi breytileiki sé milli dýra og að hlutfall smákjörnóttra frumna sé viðunandi. Ef sýnataka úr neikvæðum samanburðarhópum fer fram aðeins einu sinni er heppilegast að hún fari fram við fyrstu sýnatökuna. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg eða birt samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn eða burðarefnið, sem valið hefur verið, framkalli hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

Ef útæðablóð er notað má taka sýni fyrir meðferðina og nota sem samskeiða, neikvæðan samanburð en eingöngu í stuttum rannsóknum á útæðablóði (t.d. við 1–3 meðferðir) þegar niðurstöðurnar eru innan þeirra gilda sem vænta mátti út frá rannsóknarsögulegum gögnum.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Í hverjum meðferðarhópi og hverjum samanburðarhópi skulu vera a.m.k. fimm greiningarbær dýr af hvoru kyni (11. heimild). Ef gögn liggja fyrir, þegar rannsóknin er gerð, úr rannsóknum á sömu dýrategund og með sömu váhrifaleið og gögnin sýna að enginn umtalsverður munur er á eiturhrifum eftir kyni þá nægir að prófunin fari fram á dýrum af öðru kyninu. Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni dýrsins sem við á hverju sinni.

1.5.2. **Meðferðaráætlun**

Ekki er unnt að mæla með neinni staðlaðri meðferðaráætlun (þ.e.a.s. einni, tveimur eða fleiri meðferðum á 24 klukkustunda fresti). Sýni samkvæmt langvarandi skömmtunarfyrirkomulagi teljast gild svo fremi að jákvæð áhrif hafi verið staðfest að því er varðar rannsóknina eða, ef um neikvæða rannsókn er að ræða, eiturhrif hafi verið staðfest eða háskammturinn hafi verið notaður og skammtagjöf haldið áfram fram að sýnatökutíma. Prófunarefni má þó einnig gefa í tveimur áföngum, þ.e. meðferðin skiptist í tvær gjafir á sama degi og skulu ekki líða nema fáeinar klukkustundir á milli en þannig er auðveldara að gefa mikið rúmmál efnis.

Tilhögun prófunarinnar getur verið tvenns konar:

a) Dýrin fá meðferð einu sinni með prófunarefninu. Sýni úr beinmerg eru tekin a.m.k. tvisvar með hæfilegu millibili og skal sýnataka ekki hefjast fyrr en 24 klukkustundum eftir meðferð og henni ljúka ekki síðar en 48 klukkustundum eftir meðferð. Það skal stutt rökum ef sýni eru tekin áður en 24 klukkustundir eru liðnar frá meðhöndlun. Sýni úr útæðablóði eru tekin a.m.k. tvisvar með hæfilegu millibili og skal sýnataka hefjast ekki fyrr en 36 klst. eftir meðferð og henni ljúka ekki síðar en 72 klukkustundum eftir meðferð. Komi jákvæð svörun fram við eina sýnatökuna er ekki þörf á frekari sýnatökum.

b) Ef meðferð fer fram tvisvar á dag eða oftar (t.d. meðferð tvisvar sinnum eða oftar á 24 klukkustunda fresti) skulu sýni tekin einu sinni á tímabilinu frá því að 18–24 klukkustundir eru liðnar frá lokameðferð, ef um beinmerg er að ræða, og einu sinni á tímabilinu frá því að 36–48 klukkustundir eru liðnar frá lokameðferð ef um útæðablóð er að ræða (12. heimild).

Auk þess má taka sýni á öðrum tímum ef við á.

1.5.3. **Skammtastærðir**

Ef engin nothæf gögn liggja fyrir og framkvæma þarf skammtastærðarrannsókn skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni og kyni tilraunadýrs og í meginrannsókninni og meðferðaráætlunin skal vera hin sama í báðum tilvikum (13. heimild). Ef um eiturhrif er að ræða skal nota þrjár skammtastærðir áður en sýni eru tekin í fyrsta sinn. Þessum skammtastærðum skal hagað þannig að eiturhrifin verði allt frá því að vera í hámarki og niður í það að vera lítil eða engin. Þegar sýni eru tekin síðar nægir að nota eingöngu stærsta skammtinn. Stærsti skammturinn er skilgreindur sem sá skammtur sem kallar fram þannig merki um eiturhrif að búast megi við því, miðað við óbreytta skömmtunaráætlun, að stærri skammtar valdi dauða. Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða efni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmtum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og jafnskiptingarræsar) og þau skulu metin hvert um sig. Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í beinmerg (t.d. ef hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum í beinmerg eða útæðablóði minnkar).

1.5.4. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar og er gefin í einum áfanga eða í tveimur áföngum á sama degi og ef erfðaeiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Þegar um er að ræða lengri rannsóknir er viðmiðunarskammturinn 2000 mg/kg/líkamsþyngdar/dag fyrir allt að 14 daga meðferð og 1000 mg/kg/líkamsþyngdar/dag fyrir meðferð sem varir lengur en í 14 daga. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta í markprófuninni.

1.5.5. **Gjöf skammta**

Dýrunum er yfirleitt gefið prófunarefnið í maga með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu eða efninu er sprautað í kviðarhol. Gefa má efnið eftir öðrum leiðum en þá skal það stutt rökum. Það ræðst af stærð tilraunadýrsins hve mikinn vökva hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun. Rúmmálið skal ekki vera meira en 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Færa skal rök fyrir því ef rúmmálið er meira en þetta. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

1.5.6. **Undirbúningur á beinmerg eða blóði**

Beinmergsfrumur eru venjulega sóttar í lærlegg eða sköflungi dýrs strax og það hefur verið aflífað. Yfirleitt eru frumur teknar úr lærlegg eða sköflungi, sýni með þeim útbúin og þau lituð með viðurkenndum aðferðum. Útæðablóð er sótt í rófubláæðina eða aðra heppilega æð. Blóðfrumur eru litaðar þegar í stað með viðlífslitun (e. *supravital staining*) (8.–10. heimild) eða stroksýni eru útbúin og síðan lituð. Ef notaðir eru sérhæfðir DNA-litir (t.d. akridínappelsínugult (14. heimild) eða Hoechsts 33258 með pýróníni-Y (15. heimild)) má komast hjá sumum gervingum sem komið geta fram ef notaðir eru litir sem eru ekki sérhæfðir fyrir DNA. Þessi kostur útilokar ekki að notaðir séu aðrir hefðbundnir litir (t.d. Giemsa-litur). Jafnframt má nota aðrar aðferðir (t.d. sellulósasúlur til að fjarlægja kjörnóttar frumur (16. heimild)), að því tilskildu að sýnt hafi verið fram á að þær henti nægilega vel fyrir undirbúning smákjarna á rannsóknarstofum.

1.5.7. **Greining**

Hlutfall óþroskaðra rauðkorna á móti öllum (óþroskuðum + þroskuðum) rauðkornum er ákvarðað fyrir hvert dýr með því að telja a.m.k. 200 rauðkorn í beinmergssýni og 1000 rauðkorn í sýni með útæðablóði (17. heimild). Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæð og neikvæð samanburðarsýni, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu. Meta skal a.m.k. 2000 óþroskuð rauðkorn fyrir hvert dýr til að finna hlutfall smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna. Frekari upplýsinga má afla með því að meta smákjarna í þroskuðum rauðkornum. Við skoðun sýnisglerja skal hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum ekki vera undir 20% af samanburðargildinu. Ef dýr eru í stöðugri meðferð í fjórar vikur eða lengur er líka heimilt að skoða a.m.k. 2000 þroskuð rauðkorn fyrir hvert dýr til að meta hlutfall smákjarna. Kerfi, þar sem sjálfvirkri greiningu er beitt (myndgreiningu og flæðisgreiningu frumusvifblandna), geta komið í stað handvirks mats ef þau eru nægilega rökstudd og fullgilt.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Tilraunaeiningin er eitt dýr. Skrá skal sérstaklega fyrir hvert dýr í prófuninni fjölda óþroskaðra rauðkorna, sem er metinn, fjölda smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna og fjölda óþroskaðra rauðkorna á móti öllum rauðkornum Ef dýr eru í stöðugri meðferð í fjórar vikur eða lengur skal einnig leggja fram gögn um þroskuð rauðkorn hafi slíkra gagna verið aflað. Fyrir hvert dýr skal tilgreina hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum og, ef það er talið eiga við, hundraðshluta smákjörnóttra rauðkorna. Ef engar vísbendingar eru um mismunandi svörun eftir kyni dýra er heimilt að sameina gögn fyrir bæði kynin til tölfræðilegrar greiningar.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. skammtatengd aukning á fjölda smákjörnóttra frumna eða ótvíræð aukning á fjölda smákjörnóttra frumna sem kemur fram við eina sýnatöku hjá hópi sem fær stakan skammt. Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum (18. og 19. heimild). Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum.

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessari prófun.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður í smákjarnaprófuninni benda til þess að efnið kalli fram myndun smákjarna sem orsakast af skemmd í litningum eða jafnskiptingarkerfum í rauðkornamæðrum prófunartegundarinnar. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram myndun smákjarna í óþroskuðum rauðkornum prófunartegundarinnar.

Fjalla skal um líkindi þess að prófunarefnið eða umbrotsefni þess nái út í almennu blóðrásina og þó einkum markvefinn (t.d. altæk eiturhrif).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik líkamsþyngdar fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— gögn um jákvæðan samanburð og neikvæðan samanburð (með burðarefni eða leysi),

— gögn úr skammtastærðarrannsókn, hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— rökstuðningur fyrir vali á íkomuleið,

— aðferðir til að sannreyna að prófunarefnið hafi náð út í almennu blóðrásina, eða markvefinn ef við á,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— ítarleg lýsing á áætlunum um meðferð og sýnatöku,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— viðmiðanir fyrir mat á smákjörnóttum, óþroskuðum rauðkornum,

— fjöldi frumna sem eru skoðaðar úr hverju dýri,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif,

— hlutfall óþroskaðra rauðkorna af öllum rauðkornum,

— fjöldi smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna, tilgreindur sérstaklega fyrir hvert dýr,

— meðaltal ± staðalfrávik smákjörnóttra, óþroskaðra rauðkorna fyrir hvern hóp,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar og aðferðir sem eru notaðar,

— gögn um samskeiða, neikvæðan samanburð og rannsóknarsögulegan, neikvæðan samanburð,

— gögn um samskeiða, jákvæðan samanburð.

— Umfjöllun um niðurstöðurnar.

— Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Heddle, J.A., (1973) A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, bls. 187-190.

2) Schmid, W., (1975) The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, bls. 9-15.

3) Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. and Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. Mutation Res., 123, bls. 61-118.

4) Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. and Heddle, J.A., (1990) The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, bls. 29-80.

5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M., (1983) Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. Iin: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, bls. 555-558.

6) MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., and Wild, D., (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erytrocytes. Mutation Res., 189, bls. 103-112.

7) MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., and Shelby, M.E., (1990) The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. Fund. Appl. Toxicol., 14, bls. 513-522.

8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr., (1990) The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. Mutation Res., 245, bls. 245-249.

9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test, (1992) Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. Mutation Res., bls. 278, 83-98.

10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), (1995) Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, bls. 153-159.

11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B., (1994) In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Mutation Res., 312, bls. 293-304.

12) Higashikuni, N. and Sutou, S., (1995) An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis, 10, bls. 313-319.

13) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Rochold, M., (1992) Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 313-319.

14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr., (1983) An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. Mutation Res., 120, bls. 241-247.

15) MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Langlois, R.G., (1983) A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. Mutation Res., 120, bls. 269-275.

16) Romagna, F. and Staniforth, C.D., (1989) The automated bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 213, bls. 91-104.

17) Gollapudi, B. and McFadden, L.G., (1995) Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. Mutation Res., 347, bls. 97-99.

18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L., (1990) In Vivo Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 115-141.

19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K., (1989) Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 184-232.

B.13/14. STÖKKBREYTANDI HRIF: PRÓFUN Á BAKSTÖKKBREYTINGUM HJÁ BAKTERÍUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 471 um prófanir: prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum (1997).

1.1. INNGANGUR

Í prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum eru notaðir stofnar af amínósýruþurfandi *Salmonella typhimurium* og *Escherichia coli* til að greina punktbreytingar sem felast í skiptum, viðbót eða úrfellingu eins eða fáeinna basapara í DNA (1.–3. heimild). Þessi prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum byggist á því að greina stökkbreytingar sem snúa til baka stökkbreytingum, sem eru fyrir í prófunarstofnunum, og endurvekja hæfni bakteríunnar til að mynda lífsnauðsynlega amínósýru. Bakstökkbreyttu bakteríurnar greinast út frá hæfni þeirra til að vaxa í æti sem skortir þá amínósýru sem bakterían af móðurprófunarstofninum þurfti til vaxtar.

Punktbreytingar eru orsök margra erfðasjúkdóma hjá mönnum og haldgóðar vísbendingar eru fyrir því að punktbreytingar í æxlisgenum og æxlisbælandi genum í líkamsfrumum komi við sögu við æxlismyndun í mönnum og tilraunadýrum. Prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum er fljótgerð, ódýr og tiltölulega auðveld í framkvæmd. Margir prófunarstofnanna hafa ýmsa eiginleika sem gera þá viðkvæma með tilliti til stökkbreytinga og því henta þeir vel til að greina slíkar breytingar, m.a. vegna svargæfra DNA-raða á stöðum þar sem bakstökkbreyting á sér stað, vegna aukins gegndræpis frumna gagnvart stórsameindum og vöntunar á DNA-viðgerðarkerfum eða vegna aukningar á villuhneigðum DNA-viðgerðarferlum. Sérhæfni prófunarstofnanna getur veitt gagnlegar upplýsingar um tegundir stökkbreytinga sem erfðaeiturefni kalla fram. Fyrir liggur mjög umfangsmikill gagnagrunnur um niðurstöður varðandi margvíslega þætti í tengslum við prófanir á bakstökkbreytingum hjá bakteríum og fyrir liggja almennt viðurkenndar aðferðir til að prófa íðefni með mismunandi eðlisefnafræðilega eiginleika, m.a. rokgjörn efni.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Prófun á bakstökkbreytingum hjá annaðhvort *Salmonella typhimurium* eða *Escherichia coli* greinir stökkbreytingar í amínósýruþurfandi stofni (histidín eða trýptófan) þannig að fram kemur stofn sem er ekki háður því að viðkomandi amínósýru sé bætt við í ætið.

Stökkbreytivaldar sem valda skiptum á basapörum eru efni sem kalla fram skipti á bösum í DNA. Í prófun á bakstökkbreytingu getur þessi breyting orðið þar sem upphaflega stökkbreytingin varð eða á öðrum stað í genamengi bakteríunnar.

Fasabreytandi efni eru efni sem orsaka álagningu eða úrfellingu eins eða fleiri basapara í DNA-sameind þannig að lesramminn í RNA-sameind breytist.

1.3. ATRIÐI SEM ÞARF AÐ HAFA Í HUGA Í UPPHAFI

Í prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum eru notaðar dreifkjarna frumur sem eru frábrugðnar spendýrafrumum að því er varðar þætti á borð við upptöku, efnaskipti, litningabyggingu og DNA-viðgerðarferli. Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Efnaskiptavirkjun í glasi getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim skilyrðum sem ríkja í lífi hjá spendýrum. Prófunin veitir því ekki beinar upplýsingar um stökkbreytandi og krabbameinsmyndandi mátt efnis hjá spendýrum.

Prófun á bakstökkbreytingum hjá bakteríum er yfirleitt notuð sem frumskimun fyrir erfðaeiturvirkni og þá einkum virkni sem felst í framköllun punktbreytinga. Umfangsmikill gagnagrunnur staðfestir að mörg efni, sem eru jákvæð í þessari prófun, sýna einnig stökkbreytandi virkni í öðrum prófunum. Dæmi eru um stökkbreytivalda sem greinast ekki með þessari prófun og má skrifa ástæðurnar fyrir þessum annmarka á eðli endapunkts prófunarinnar, breytileika í efnaskiptavirkjun eða mismunandi lífaðgengi. Á hinn bóginn geta þættir, sem auka næmi prófunar á bakstökkbreytingum hjá bakteríum, orðið til þess að stökkbreytandi virkni efnis er ofmetin.

Prófunin á bakstökkbreytingum hjá bakteríum er e.t.v. ekki heppileg til að meta íðefni í tilteknum flokkum, t.d. efnasambönd með mjög öfluga bakteríueyðandi virkni (t.d. tiltekin sýklalyf) og þau sem talið er (eða vitað er) að raski einkum eftirmyndunarkerfi spendýrafrumna (t.d. sumir tópóísómerasahemlar og sumar kirnisleifahliðstæður). Í þeim tilvikum getur prófun á stökkbreytingum hjá spendýrum átt betur við.

Þótt mörg efnasambönd, sem gefa jákvæða svörun í þessari prófun, séu krabbameinsvaldar hjá spendýrum er ekki um algera fylgni að ræða þarna á milli. Fylgnin er háð flokki efnisins og til eru krabbameinsvaldar sem greinast ekki með þessari prófun þar eð áhrif þeirra byggjast á gangvirkjum, sem fela ekki í sér erfðaeiturvirkni, eða gangvirkjum sem eru ekki í bakteríufrumum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Bakteríusvifblöndur eru látnar komast í snertingu við prófunarefnið, bæði með útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Í aðferðinni með ísetningu á skál (e. *plate incorporation method*) er þessum svifblöndum blandað saman við yfirborðsagar og sáð strax á grunnæti. Í forræktunaraðferðinni (e. *preincubation method*) er meðferðarblandan ræktuð og henni síðan blandað saman við yfirborðsagar áður en henni er sáð á grunnæti. Í báðum aðferðum er ræktun látin vara í tvo eða þrjá daga og síðan eru þyrpingar með bakstökkbreyttum bakteríum taldar og fjöldinn borinn saman við fjölda þyrpinga með sjálfsprottnum, bakstökkbreyttum bakteríum á samanburðarskálum með leysi.

Allmörgum aðferðum við framkvæmd prófunar á bakstökkbreytingum hjá bakteríum hefur verið lýst. Af algengum aðferðum má nefna aðferðina með ísetningu á skál (1.–4. heimild), forræktunaraðferðina (2., 3., 5, 6., 7. og 8. heimild), sveifluaðferðina (e. *fluctuation method*) (9. og 10. heimild) og svifblönduaðferðina (e. *suspension method*) (11. heimild). Breytingum vegna prófana á gösum eða gufum hefur verið lýst (12. heimild).

Verkferlin, sem hér er lýst, eiga fyrst og fremst við um aðferðina með ísetningu á skál og forræktunaraðferðina. Þær henta báðar til að gera tilraunir bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Sum efni greinast hugsanlega betur þegar forræktunaraðferðin er notuð. Efnin eru úr flokkum sem í eru m.a. stutt, alifatísk nítrósamín, tvígildir málmar, aldehýð, asólitir og díasósambönd, pýrollisidínlýtingar, allýlsambönd og nítrósambönd (3. heimild). Einnig er viðurkennt að stökkbreytivaldar í tilteknum flokkum greinast ekki alltaf þegar notuð eru stöðluð verkferli á borð við aðferðina með ísetningu á skál og forræktunaraðferðina. Með slík tilvik skal fara sem „sértilvik“ og sterklega er mælst til þess að notuð séu staðgönguverkferli til að greina þau. Eftirfarandi „sértilvik“ mætti nefna (ásamt dæmum um verkferli sem mætti nota við greiningu þeirra): asó-litir og díasóefnasambönd (3., 5., 6. og 13. heimild), gastegundir og rokgjörn íðefni (12., 14., 15. og 16. heimild) og glýkósíð (17. og 18. heimild). Færa skal vísindaleg rök fyrir öllum frávikum frá staðlaða verkferlinu.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Undirbúningur**

1.5.1.1. *Bakteríur*

Ferskar ræktir með bakteríum skulu látnar vaxa þar til þær hafa náð síðari hluta veldisfasa eða fyrri hluta stöðufasa (u.þ.b. 10^9 frumur á ml). Ekki skal nota ræktir sem hafa náð síðari hluta stöðufasa. Mikilvægt er að í ræktum, sem eru notaðar í tilrauninni, sé mikill fjöldi lífvænlegra baktería. Staðfesta má fjöldann, annaðhvort með rannsóknarsögulegum samanburðargögnum um vaxtarferla eða í hverri greiningu með því að ákvarða fjölda lífvænlegra frumna með skálaaðferðinni.

Æskilegur ræktunarhiti er 37 °C.

Nota skal a.m.k. fimm stofna baktería. Þar skulu vera fjórir stofnar af *S. typhimurium* (TA 1535, TA 1537 eða TA97a eða TA97, TA98 og TA100) sem hafa reynst vera áreiðanlegir og með samanburðarnákvæma svörun milli rannsóknarstofa. Þessir fjórir stofnar *S. typhimurium* eru með GC-basapör á helsta staðnum þar sem bakstökkbreyting verður og vitað er að þeir greina ekki alltaf tiltekna oxandi stökkbreytivalda, efni sem valda víxltengslum eða hýdrasín. Til að greina slík efni má nota stofna *E. coli* WP2 eða *S. typhimurium* TA102 (19. heimild) sem eru með AT-basapar á helsta bakstökkbreytingastað. Því er mælt með eftirfarandi samsetningu stofna:

— *S. typhimurium* TA1535 og

— *S. typhimurium* TA1537 eða TA97 eða TA97a og

— *S. typhimurium* TA98 og

— *S. typhimurium* TA100 og

— *E. coli* WP2 uvrA eða *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) eða *S. typhimurium* TA102.

Til að greina stökkbreytivalda sem orsaka þvertengsl getur verið heppilegt að bæta við TA102 eða stofni af *E. coli* sem býr yfir færni til viðgerða á DNA (t.d. *E. coli* WP2 eða *E. coli* WP2 (pKM101)).

Nota skal viðurkennd verkferli við tilreiðslu stofnræktar, sanngreiningu erfðamarks og geymslu. Sýna skal fram á hvaða amínósýrur eru nauðsynlegar til vaxtar fyrir hverja frosna stofnrækt (histidín fyrir stofna af *S. typhimurium* og trýptófan fyrir stofna af *E. coli*). Á svipaðan hátt skal kanna aðra svipfarseiginleika, nánar tiltekið hvort R-þáttarplasmíð séu fyrir hendi eða ekki, eftir því sem við á (þ.e. þol gegn ampisillíni í stofnum TA98, TA100 og TA97a eða TA97, WP2 uvrA og WP2 uvrA (pKM101) og þol gegn ampisillíni + tetrasýklíni í stofni TA102) og hvort fram komi einkennandi stökkbreytingar (þ.e. rfa-stökkbreyting í *S. typhimurium* vegna næmis fyrir kristalsfjólubláum lit og uvrA-stökkbreyting í *E. coli* eða uvrB-stökkbreyting í *S. typhimurium* vegna næmis fyrir útfjólubláu ljósi) (2. og 3. heimild). Stofnarnir skulu einnig gefa fjölda þyrpinga með sjálfsprottnum, bakstökkbreyttum bakteríum sem eru innan þess tíðnibils sem vænta má út frá rannsóknarsögulegum samanburðargögnum rannsóknarstofunnar og helst innan þess bils sem er tilgreint í heimildum.

1.5.1.2. *Æti*

Notaður er viðeigandi grunnagar (sem inniheldur t.d. Vogel-Bonner-grunnæti-E og glúkósa) og yfirborðsagar með histidíni og bíótíni eða trýptófani þannig að nokkrar frumuskiptingar geti orðið (1., 2. og 9. heimild).

1.5.1.3. *Efnaskiptavirkjun*

Bakteríur skulu látnar komast í snertingu við prófunarefnið, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Algengast er að nota kerfi með hvatberasneyddum frumusafa (S9) með viðbættum hjálparþætti sem er unninn úr lifur nagdýra og meðhöndlaður með ensímvirkjum, s.s. Aroclor 1254 (1. og 2. heimild), eða blöndu fenóbarbítóns og β-naptóflavóns (18., 20. og 21. heimild). Hvatberasneyddi frumusafinn er venjulega notaður í styrk sem er frá 5–30%, að rúmmálshlutfalli, í S9-blöndunni. Val á efnaskiptavirkjunarkerfi og ástand kerfisins geta ráðist af því úr hvaða flokki efna prófunaríðefnið er. Í sumum tilvikum getur hentað að nota hvatberasneydda frumusafann í meira en einum styrkleika. Afoxandi efnaskiptavirkjunarkerfi er e.t.v. heppilegra fyrir asóliti og díasósambönd (6. og 13. heimild).

1.5.1.4. *Undirbúningur prófunarefnis*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en bakteríurnar eru meðhöndlaðar. Fljótandi prófunarefni má setja beint út í prófunarkerfin og/eða þynna þau fyrir meðferðina. Nota skal ferskar blöndur nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

Ekki má nota leysi eða burðarefni sem grunur leikur á að geti hvarfast við prófunarefnið og leysirinn eða burðarefnið má hvorki skerða lifun bakteríanna né S9-virknina (22. heimild). Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Ef prófuð eru efni sem eru óstöðug í vatni skulu notaðir lífrænir leysar án vatns.

1.5.2. **Prófunarskilyrði**

1.5.2.1. Prófunarstofnar (sjá lið 1.5.1.1)

1.5.2.2. *Váhrifastyrkur*

Frumueiturhrif og leysni í blöndunni, sem er notuð við lokameðferðina, er meðal þeirra viðmiðana sem taka þarf tillit til við ákvörðun á mesta styrk sem nota skal af prófunarefninu.

Heppilegt getur verið að ákvarða eiturhrif og leysni í fortilraun. Frumueiturhrif má greina út frá fækkun á fjölda þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum, myndun eyða í bakgrunnsvexti eða minni bakgrunnsvexti eða minni lifun hjá meðhöndluðum ræktum. Frumueiturhrif efnis geta breyst ef efnaskiptavirkjunarkerfi er til staðar. Óleysanleiki skal ákvarðaður út frá útfellingu í lokablöndunni við raunskilyrði prófunarinnar og útfellingin skal vera greinanleg berum augum.

Mælt er með því að hámarksprófunarstyrkur leysanlegra efna, sem eru ekki frumueitrandi, sé 5 mg/skál eða 5 µl/skál. Fyrir efni, sem eru ekki frumueitrandi og ekki leysanleg í magni sem er 5 mg/skál eða 5 µl/skál, skal óleysanleiki koma fram í einum eða fleiri styrkleikum, sem eru prófaðir, í blöndunni sem er notuð í lokameðferðinni. Prófunarefni, sem eru frumueitrandi þegar magnið er undir 5 mg/skál eða 5 µl/skál, skulu prófuð þar til náð er styrk sem veldur frumueiturhrifum. Útfellingin má ekki hafa áhrif á matið (e. *scoring*).

Nota skal a.m.k. fimm mismunandi, greiningarbæra styrkleika prófunarefnisins og hafa bil, sem nemur u.þ.b. hálfum lygra (þ.e. $\sqrt{10}$), milli prófunarpunkta í upphafstilraun. Minni bil geta verið heppileg ef verið er að kanna sambandið milli styrks og svörunar. Prófun við styrk yfir 5 mg/skál eða 5 µl/skál kemur til greina þegar verið er að meta efni sem innihalda umtalsvert magn af óhreinindum sem eru hugsanlega stökkbreytandi.

1.5.2.3. *Neikvæður og jákvæður samanburður*

Í hverri tilraun skal vera samskeiða, stofnsértækur, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Velja skal þá styrkleika efnis í jákvæða samanburðinum sem leiða í ljós skilvirkni viðkomandi tilraunar.

Í prófunum, þar sem efnaskiptavirkjun er notuð, skal velja viðmiðunarefni fyrir jákvæða samanburðinn út frá því hvaða bakteríustofn er notaður.

Eftirfarandi efni eru m.a. heppileg til notkunar í jákvæðum samanburði í prófunum með efnaskiptavirkjun.

CAS-númer	EINECS-númer	Efni
781-43-1	212-308-4	9,10-dímetýlantrasen
57-97-6	200-359-5	7,12-dímetýlbens[a]antrasen
50-32-8	200-028-5	bensó(a)pýren
613-13-8	210-330-9	2-amínóantrasen
50-18-0		sýklófosfamíð
6055-19-2	200-015-4	sýklófosfamíðmónóhýdrat

Eftirfarandi efni er heppilegt til jákvæðs samanburðar í aðferðinni þar sem afoxandi efnaskiptavirkjun er notuð.

CAS-númer	EINECS-númer	Efni
573-58-0	209-358-4	Kongórautt

Þegar virkni S9-blöndunnar er metin skal 2-amínóantrasen ekki vera eini vísirinn sem er notaður. Ef 2-amínóantrasen er notað skal einnig greina eðli hverrar S9-framleiðslulotu með stökkbreytivaldi sem krefst efnaskiptavirkjunar með netbóluensímum (e. *microsomal enzymes*), t.d. bensó[a]pýreni eða dímetýlbensantraseni.

Eftirfarandi efni eru m.a. heppileg til notkunar í jákvæðum samanburði í stofnsértækum prófunum án útræns efnaskiptavirkjunarkerfis.

CAS-númer	EINECS-númer	Efni	Stofn
26628-22-8	247-852-1	natríumasíð	TA 1535 og TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nítróflúoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-amínóakridín	TA 1537, TA 97 og TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 og TA 97a
80-15-9	201-254-7	kúmenhýdróperoxíð	TA 102
50-07-7	200-008-6	mítómýsín C	WP2 uvrA og TA102

CAS-númer	EINECS-númer	Efni	Stofn
70-25-7	200-730-1	N-etýl-N-nítró-N-nítrósóguanidín	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nítrókínólín-1-oxíð	WP2, WP2uvrA og WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		fúrýlfúramíð (AF2)	stofnar með plasmíði

Nota má önnur viðeigandi viðmiðunarefni við jákvæðan samanburð. Kanna skal hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, ef þau eru tiltæk.

Í prófuninni skal vera neikvæður samanburður, sem er leysir eða burðarefni eingöngu, án prófunarefnis, en fær að öðru leyti sömu meðhöndlun og prófunarræktirnar. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, hafi hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

1.5.3. **Verkferli**

Í aðferðinni með ísetningu á skál (1.–4. heimild), þar sem efnaskiptavirkjun er ekki notuð, er algengt að blanda 0,05 ml eða 0,1 ml af prófunarlausnum, 0,1 ml af ferskri bakteríurækt (með u.þ.b. 10^8 lífvænlegum frumum) og 0,5 ml af sæfðri jafnalausn saman við 2,0 af yfirborðsagar. Þegar prófun er gerð með efnaskiptavirkjun er algengt að blanda 0,5 ml af efnaskiptavirkjunarblöndu, sem inniheldur hæfilegt magn af hvatberasneyddum frumusafa (á bilinu frá 5–30%, að rúmmálshlutfalli, í efnaskiptavirkjunarblöndunni), saman við yfirborðsagar (2,0 ml) ásamt bakteríunum og prófunarefni eða prófunarlausn. Innihaldi allra tilraunaglasanna er blandað saman og hellt á yfirborð skálar með grunnagar. Yfirborðsagarinn er látinn stirðna áður en ræktun hefst.

Í forræktunaraðferðinni (2., 3., 5. og 6. heimild) er prófunarefnið eða prófunarlausnin forræktuð með prófunarstofninum (með u.þ.b. 108 lífvænlegum frumum) og sæfðri jafnalausn eða efnaskipta-virkjunarkerfinu (0,5 ml), venjulega í 20 mínútur eða lengur við 30–37 °C, áður en þessu er blandað saman við yfirborðsagarinn og hellt á yfirborð skálar með grunnæti. Algengt er að blanda 0,05 eða 0,1 ml af prófunarefni eða prófunarlausn, 0,1 ml af bakteríum og 0,5 ml af S9-blöndunni eða sæfðri jafnalausn saman við 2,0 ml af yfirborðsagar. Tilraunaglös skulu loftuð á meðan forræktun varir með því að setja þau í hristara.

Til að unnt sé að meta breytileika með fullnægjandi hætti skal nota þrjár skálar fyrir hvern styrkleika. Tvær skálar nægja ef gild, vísindaleg rök eru færð fyrir því. Þótt ein og ein skál fari forgörðum þarf það ekki að ógilda prófunina.

Loftkennd eða rokgjörn efni skulu prófuð með viðeigandi aðferðum, t.d. í lokuðum ílátum (12., 14., 15. og 16. heimild).

1.5.4. **Ræktun**

Allar skálar í hverri prófun skulu ræktaðar við 37 °C í 48–72 klukkustundir. Að loknu ræktunarskeiðinu er fjöldi þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum talinn.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gögn skulu sett fram sem fjöldi þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum á hverri skál. Einnig skal tilgreina fjölda þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum, bæði fyrir skálar vegna neikvæða samanburðarins (samanburðar með leysi og ómeðhöndlaðs samanburðar, ef hann er notaður) og vegna jákvæða samanburðarins. Fyrir hverja skál skal tilgreina fjölda þyrpinga, meðaltal þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum og staðalfrávik að því er varðar prófunarefnið og jákvæða samanburðinn og neikvæða samanburðinn (engin meðhöndlun og/eða með leysi).

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri svörun. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum. Ef niðurstöður eru neikvæðar þarf að staðfesta þær í hverju tilviki um sig. Sé ekki talin þörf á því að staðfesta neikvæðar niðurstöður skal færa rök fyrir

því. Í eftirfylgnitilraunum skal vega og meta hvort breyta skuli mæliþáttum rannsóknarinnar til að víkka svið tilraunaskilyrðanna sem matið tekur til. Meðal þátta í rannsókninni, sem kemur til álita að breyta, er bilið milli mismunandi skammtastyrkleika, aðferð við meðhöndlun (skálaaðferð eða forræktun í lausn) og skilyrðin við efnaskiptavirkjunina.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. styrktengd aukning á því bili, sem prófað er á, og/eða samanburðarnákvæm fjölgun þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum á hverri skál við einn eða fleiri styrkleika og fyrir a.m.k. einn stofn með efnaskiptavirkjunarkerfi eða án þess (23. heimild). Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum (24. heimild). Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð.

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessari prófun.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður úr prófuninni á bakstökkbreytingum í bakteríum benda til þess að efnið kalli fram punktbreytingar, sem felast í basaskiptum eða breytingu á lesramma, í genamengi annaðhvort *Salmonella typhimurium* og/eða *Escherichia coli*. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin sé prófunarefnið ekki stökkbreytandi hjá þeirri dýrategund sem er notuð í prófuninni.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á leysi eða burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Stofnar:

— stofnar sem eru notaðir,

— fjöldi frumna í hverri rækt,

— eiginleikar stofna.

Prófunarskilyrði:

— magn prófunarefnis fyrir hverja skál (mg/skál eða µl/skál) ásamt forsendum fyrir vali á magni og fjölda skála fyrir hvern styrkleika,

— æti sem er notað,

— tegund og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfis, m.a. viðmiðanir fyrir ásættanleika.

— verkferli við meðhöndlun.

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif,

— merki um útfellingu,

— fjöldi fyrir hverja skál,

— meðalfjöldi þyrpinga með bakstökkbreyttum bakteríum fyrir hverja skál ásamt staðalfráviki,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef um þær er að ræða,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, bls. 347-364.

2) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, bls. 173-215.

3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E., (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. Mutation Res., 312, bls. 217-233.

4) Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. and Ray V., (1986) The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 168, bls. 69-240.

5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y., (1975) Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer Letters, 1, bls. 91-96.

6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M., (1980) Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. bls. 273-285.

7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R., (1980) Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, bls. 13-61.

8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L., (1987) Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. J. Food Safety, 8, bls. 167-177.

9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A., (1976) Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. Mutation Res., 38, bls. 33-42.

10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984) The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, bls. 141-161.

11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J., (1981) An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. Environmental Mutagenesis, 3, bls. 453-465.

12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994) Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. Mutation Res., 307, bls. 335-344.

13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L., (1984) Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. Mutation Res., 136, bls. 33-47.

14) Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K., (1992) Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. Environ. Mol. Mutagen., 19, bls. 2-141.

15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R.G., (1977) Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, bls. 249-258.

16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D., (1987) Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. Environmental Mutagenesis, 9, bls. 421-441.

17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T., (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in Salmonella typhimurium. Cancer Res., 39, bls. 3780-3782.

18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N., (1980) Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, bls. 4961-4965.

19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. and Gatehouse, D.G., (1990) Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 Tester strains. Mutagenesis, 5, bls. 285-291.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "In vitro metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, bls. 85-88.

21) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 175-177.

22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N., (1981) Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. Mutation Res., bls. 88343-350.

23) Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E., (1987) Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. Mutation Res. 189, bls. 83-91.

24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J., (1989) Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, bls. 28-65.

B.15. PRÓFUN Á STÖKKBREYTANDI HRIFUM OG SKIMUN FYRIR KRABBAMEINSVALDANDI GENASTÖKKBREYTINGUM — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Hægt er að nota ýmsa einlitna og tvílitna stofna gersveppsins *Saccharomyces cerevisiae* til að mæla tilurð genastökkbreytinga af völdum efnafræðilegra áhrifavalda, með og án efnaskiptavirkjunar.

Notuð hafa verið frumstökkbreytingarkerfi í einlitna stofnum, eins og t.d. mæling á stökkbreytingu rauðra, adenínþurfandi stökkbrigða (*ade*-1, *ade*-2) yfir í tvöföld adenínþurfandi, hvít stökkbrigði, og valvís kerfi eins og framköllun þols fyrir kanavnaíni og sýklóheximíði.

Algengasta, fullgilta kerfi bakstökkbreytinga byggist á notkun einlitna stofnsins XV-185-14C, sem ber okkurgulu markleysubreytingarnar *ade*-2-1, *arg*-4-17, *lys*-1-1 og *trp*-5-48, sem hægt er að snúa við með stökkbreytivöldum sem valda basaskiptum og framkalla setvissar stökkbreytingar eða okkurgular bælistökkbreytingar. Einnig ber XV-185-14C erfðamerkið *his*-1-7, sem er mislestursbreyting (e. *missense mutation*) sem snýst við, aðallega við stökkbreytingar í öðru seti, sem og erfðamerkið *hom*-3-10, sem er snúið við með fasabreytandi stökkbreytivöldum.

Eini almennt notaði tvílitna stofninn af *S. cerevisiae* er D7 sem er arfhreinn í *ilv*-1-92.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Tilreiða skal lausnir prófunaríðefna og samanburðarefna rétt fyrir prófun og nota viðeigandi burðarefni. Ef notuð eru lífræn efnasambönd, sem eru ekki leysanleg í vatni, skal nota lausn með allt að 2% rúmmálshlutfalli lífrænna leysa á borð við etanól, aseton eða dímetýlsúlfoxíð (DMSO). Lokastyrkur burðarefnis má ekki hafa markverð áhrif á lífvænleika og vaxtareinkenni frumna.

Efnaskiptavirkjun

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnunum, bæði með viðeigandi, útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess.

Algengast er að nota kerfi með hjálparþáttarbættum, hvatberasneyddum frumusafa úr lifrum nagdýra sem hafa verið formeðhöndluð með ensímvirkjum. Notkun á öðrum dýrategundum, vefjum, hvatberasneyddum frumusöfum eða verkferlum getur einnig hentað til að virkja efnaskipti.

Prófunarskilyrði

Prófunarstofnar

Einlitna stofninn XV-185-14C og tvílitna stofninn D7 eru algengastir í rannsóknum á genastökkbreytingum. Aðrir stofnar geta einnig hentað.

Æti

Við ákvörðun á lifun og fjölda stökkbrigða er notað viðeigandi ræktunaræti.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Jákvæður samanburður, ómeðhöndlaður samanburður og samanburður með leysi skal ræktaður samskeiða prófunarræktunum. Nota skal viðeigandi, jákvæð samanburðaríðefni fyrir hvern einstakan endapunkt stökkbreytingar.

Váhrifastyrkur

Nota skal minnst fimm styrkleikastig af prófunarefninu með nægilegum styrkleikamun. Ef prófa á eiturefni skal mesti styrkur ekki minnka lifun niður fyrir 5–10%. Efni með hlutfallslega litla vatnsleysni skal prófa upp að leysnimörkum og nota viðeigandi verkferli. Ákvarða skal efri styrkmörk í hverju tilviki fyrir sig þegar um er að ræða óeitruð efni sem eru auðleyst í vatni.

Ræktunarskilyrði

Skálarnar eru hafðar í ræktun í myrkri í 4–7 daga við 28–30 °C.

Tíðni sjálfsprottinna stökkbreytinga

Nota skal undirræktir þar sem tíðni sjálfsprottinna stökkbreytinga er innan viðtekinna, eðlilegra marka.

Fjöldi samhliða skála

Nota skal minnst þrjár samhliða skálar fyrir hvern styrkleika til ákvörðunar á alefna lífverum, sem myndast við genastökkbreytingu, og til ákvörðunar á frumulífvænleika. Í tilraunum þar sem notuð eru erfðamörk, á borð við *hom* 3–10, með lága tíðni stökkbreytinga þarf að fjölga skálum til að fá tölfræðilega marktæk gögn.

Verkferli

Meðhöndlun á stofnum *S. cerevisiae* fer venjulega fram með vökvaprófunarferli með annaðhvort stöðugum frumum eða frumum í vexti. Upphafstilraunir skulu gerðar með frumum í vexti: $1–5 \times 10^7$ frumur/ml eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í allt að 18 klukkustundir við 28–37 °C og með hristingi og er hæfilegu magni af efnaskiptavirkjunarkerfi bætt í meðan á meðferðinni stendur ef við á. Í lok meðferðarinnar eru frumurnar skildar frá í skilvindu, þvegnar og þeim sáð á viðeigandi ræktunaræti. Eftir ræktun er lifun og fjöldi genabreytinga, sem hefur framkallast, skráð fyrir hverja skál. Ef fyrsta tilraunin er neikvæð skal gera aðra tilraun með frumum í stöðufasa. Ef fyrsta tilraunin er jákvæð er það staðfest með viðeigandi, óháðri tilraun.

2. **GÖGN**

Gögn skal setja fram í töfluformi þar sem fram kemur hversu margar þyrpingar voru taldar, hversu mörg stökkbrigðin eru, lifunarhlutfall og tíðni stökkbrigða. Allar niðurstöður skulu staðfestar með óháðri tilraun. Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— stofn sem er notaður,

— prófunarskilyrði: frumur í stöðufasa eða í vexti, samsetningar á æti, hitastig við ræktun, ræktunartími og efnaskiptavirkjunarkerfi,

— meðferðaraðstæður: váhrifastyrkleikar, meðferðarferli og meðferðartími, hitastig við meðferð og jákvæður og neikvæður samanburður,

— fjöldi þyrpinga sem voru taldar, fjöldi stökkbrigða, lifunarhlutfall og tíðni stökkbrigða, tengsl milli skammts og svörunar, ef við á, og tölfræðilegt mat á gögnum,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.16. **ENDURRÖÐUN Í JAFNSKIPTINGU — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Hjá *Saccharomyces cerevisiae* má greina endurröðun í jafnskiptingu (e. *mitosis*) milli gena (eða öllu heldur milli gens og þráðhafts þess) og innan gena. Fyrri atburðurinn nefnist litningavíxl í jafnskiptingu og myndar gagnkvæmar afurðir en síðartaldi atburðurinn er oftast ekki gagnkvæmur og nefnist genaturnun. Litningavíxl eru almennt metin með því að framkalla víkjandi, arfhreinar þyrpingar eða svæði í arfblendnum stofni en genaturnun er metin með framköllun á alefna umsnúningum í vanefna, misbreyttum stofnum (e. *heteroallelic strain*) sem hafa tvær mismunandi, gallaðar samsætur sama gens. Algengustu stofnarnir, sem eru notaðir við leit að genaturnun í jafnskiptingu, eru D_4 (misbreyttur í *ade*-2 og *trp*-5), D_7 (misbreyttur í *trp*-5), BZ_{34} (misbreyttur í *arg*4) og JD1 (misbreyttur í *his*-4 og *trp*-5). Litningavíxl í jafnskiptingu, sem kalla fram rauð og bleik, arfhrein svæði, má meta í D_5 eða í D_7 (sem mælir einnig genaturnun í jafnskiptingu og bakstökkbreytingar í *ilv* 1–92) þar sem báðir stofnar eru misbreyttir með tilliti til uppbætandi samsætna af *ade* 2.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Útbúa skal lausnir prófunaríðefna og samanburðar- eða viðmiðunarefna rétt fyrir prófun og nota viðeigandi burðarefni. Ef notuð eru lífræn efnasambönd, sem eru ekki leysanleg í vatni, skal nota lausn með allt að 2% rúmmálshlutfalli lífrænna leysa á borð við etanól, aseton eða dímetýlsúlfoxíð (DMSO). Lokastyrkur burðarefnis má ekki hafa markverð áhrif á lífvænleika og vaxtareinkenni frumna.

Efnaskiptavirkjun

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefnunum, bæði með viðeigandi, útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Algengast er að nota kerfi með hjálparþáttarbættum, hvatberasneyddum frumusafa úr lifrum nagdýra sem hafa verið formeðhöndluð með ensímvirkjum. Notkun á öðrum dýrategundum, vefjum, hvatberasneyddum frumusöfum eða verkferlum getur einnig hentað til að virkja efnaskipti.

Prófunarskilyrði

Prófunarstofnar

Tvílitna stofnarnir D_4, D_5, D_7 og JD1 eru algengastir. Einnig koma aðrir stofnar til greina.

Æti

Við ákvörðun á lifun og endurröðun í jafnskiptingu er notað viðeigandi ræktunaræti.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Jákvæður samanburður, ómeðhöndlaður samanburður og samanburður með leysi skal ræktaður samskeiða prófunarræktunum. Nota skal viðeigandi, jákvæð samanburðarefni fyrir hvern einstakan endapunkt endurröðunar.

Váhrifastyrkleikar

Nota skal minnst fimm styrkleikastig af prófunarefninu með nægilegum styrkleikamun. Meðal þeirra þátta, sem þarf að taka tillit til, eru frumueiturhrif og leysni. Minnsti styrkurinn má ekki hafa nein áhrif á lífvænleika frumnanna. Ef prófa á eiturefni skal mesti styrkur ekki minnka lifun niður fyrir 5–10%. Efni með hlutfallslega litla vatnsleysni skal prófa upp að leysnimörkum með viðeigandi verkferlum. Ákvarða skal efri styrkmörk í hverju tilviki fyrir sig þegar um er að ræða óeitruð efni sem eru auðleyst í vatni.

Láta skal frumur verða fyrir váhrifum frá prófunarefnum í allt að 18 klukkustundir á meðan þær eru annaðhvort í stöðufasa eða vexti. Ef notaður er lengri váhrifatími ber þó að skoða ræktirnar með smásjá með tilliti til grómyndunar sem myndi ógilda prófunina.

Ræktunarskilyrði

Skálarnar eru hafðar í ræktun í myrkri í 4–7 daga við 28–30 °C. Skálar sem eru notaðar til að ákvarða rauð og bleik arfhrein svæði, sem eru fengin við litningavíxl í jafnskiptingu, skal geyma í kæliskáp (við u.þ.b. 4 °C) einn til tvo daga í viðbót áður en talning fer fram til að leyfa myndun réttra, litaðra þyrpinga.

Tíðni sjálfsprottinnar endurröðunar í jafnskiptingu

Nota skal undirræktir þar sem tíðni sjálfsprottinnar endurröðunar í jafnskiptingu er innan eðlilegra, viðurkenndra marka.

Fjöldi samhliða skála

Nota skal minnst þrjár samhliða skálar fyrir hvern styrkleika til ákvörðunar á alefna lífverum, sem myndast við genaturnun í jafnskiptingu, og til ákvörðunar á frumulífvænleika. Við prófun fyrir víkjandi arfhreinindum, sem koma fram við litningavíxl í jafnskiptingu, skal fjölga skálum til að fá fram nægilegan fjölda þyrpinga.

Verkferli

Meðhöndlun á stofnum *S. cerevisiae* fer venjulega fram með vökvaprófunarferli með annaðhvort stöðugum frumum eða frumum í vexti. Upphafstilraunir skal gera með frumum í vexti. $1–5 \times 10^7$ frumur/ml eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í allt að 18 klukkustundir við 28–37 °C og með hristingi og er hæfilegu magni af efnaskiptavirkjunarkerfi bætt í meðan á meðferðinni stendur ef við á.

Í lok meðferðarinnar eru frumurnar skildar frá í skilvindu, þvegnar og þeim sáð á viðeigandi ræktunaræti. Eftir ræktun er lifun og tíðni endurröðunar í jafnskiptingu skráð fyrir hverja skál.

Ef fyrsta tilraunin er neikvæð skal gera aðra tilraun með frumum í stöðufasa. Ef fyrsta tilraunin er jákvæð er það staðfest með óháðri tilraun.

2. **GÖGN**

Gögn skal setja fram í töfluformi þar sem fram kemur hversu margar þyrpingar voru taldar, hversu margar endurraðanir fundust, lifunarhlutfall og tíðni raðbrigða.

Allar niðurstöður skulu staðfestar með óháðri tilraun.

Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— stofn sem er notaður,

— prófunarskilyrði: frumur í stöðufasa eða í vexti, samsetningar á æti, hitastig við ræktun, ræktunartími og efnaskiptavirkjunarkerfi,

— meðferðaraðstæður: váhrifastyrkur, meðferðarferli og meðferðartími, hitastig við meðferð og jákvæður og neikvæður samanburður,

— fjöldi þyrpinga sem voru taldar, fjöldi raðbrigða, lifunarhlutfall og tíðni raðbrigða, tengsl milli skammts og svörunar, ef við á, og tölfræðilegt mat á gögnum,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.17. STÖKKBREYTANDI HRIF — PRÓFUN Í GLASI Á GENASTÖKKBREYTINGUM Í SPENDÝRAFRUMUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 476 um prófanir: prófun í glasi á genastökkbreytingum í spendýrafrumum (1997).

1.1. INNGANGUR

Nota má prófun í glasi á genastökkbreytingum í spendýrafrumum til að greina stökkbreytingar sem íðefni kalla fram. Heppilegar frumulínur eru m.a. eitlaæxlisfrumur músa, L5178Y, frumulínurnar CHO, CHO-AS52 og V79 úr kínahamstri og TK6 sem eru eitlakímfrumur úr mönnum (1. heimild). Þegar þessar frumulínur eiga í hlut eru endapunktarnir, sem algengast er að styðjast við, ákvörðun á stökkbreytingu með týmidínkínasa (TK) og hýpóxantín-gúanínfosfóríbósýltransferasa (HPRT) og aðfluttu geni fyrir xantín-gúanínfosfóríbósýltransferasa (XPRT). TK-, HPRT- og XPRT-stökkbreytingaprófanirnar greina mismunandi róf erfðafræðilegra atburða. Staðsetning TK og XPRT á A-litningi getur gert það kleift að greina erfðafræðilega atburði (t.d. miklar úrfellingar) sem greinast ekki á HPRT-genasætinu á X-litningum (2.–6. heimild).

Við prófun í glasi á genastökkbreytingum má nota ræktir skilgreindra frumulína eða frumustofna. Frumurnar, sem eru notaðar, eru valdar eftir því hve vel þær vaxa í ræktinni og því hve tíðni sjálfsprottinna stökkbreytinga er stöðug.

Prófanir, sem eru gerðar í glasi, útheimta að jafnaði útræna efnaskiptavirkjun. Efnaskiptavirkjun af þessu tagi getur ekki líkt fullkomlega eftir þeim skilyrðum sem ríkja í lífi hjá spendýrum. Þess skal gætt að ekki komi upp aðstæður sem leiða myndu til niðurstaðna sem endurspegla ekki eðlislæga, stökkbreytandi getu. Jákvæðar niðurstöður, sem endurspegla ekki eðlislæga, stökkbreytandi getu, geta stafað af breytingu á sýrustigi, osmólalstyrk eða miklum frumueiturhrifum (7. heimild).

Þessi prófun er notuð við leit að efnum sem eru hugsanlega stökkbreytivaldar og krabbameinsvaldar hjá spendýrum. Mörg efnasambönd, sem gefa jákvæða niðurstöðu í þessari prófun, eru krabbameinsvaldar í spendýrum en það er hins vegar ekki fullkomin fylgni milli þessarar prófunar og krabbameinsvaldandi eiginleika. Fylgnin er háð flokki efnisins og sífellt fleira bendir til þess að til séu krabbameinsvaldar sem greinast ekki með þessari prófun þar eð áhrif þeirra byggjast á öðrum gangvirkjum, sem fela ekki í sér erfðaeiturvirkni, eða gangvirkjum sem eru ekki í bakteríufrumum (6. heimild).

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Frumstökkbreyting: genastökkbreyting frá foreldragerð í stökkbrigði sem veldur því að ensímvirkni táknaða prótínsins breytist eða glatast.

Stökkbreytivaldur sem veldur basaskiptum: efni sem valda því að skipti verða á einu eða nokkrum basapörum í DNA-sameindinni.

Fasabreytandi efni: efni sem valda því að eitt eða nokkur basapör bætast við í DNA-sameindinni eða falla brott úr henni.

Svipfarstjáningartími: sá tími sem það tekur fyrir óbreyttar genaafurðir að hverfa úr nýlega stökkbreyttum frumum.

Tíðni stökkbrigða: fjöldi stökkbreyttra frumna deilt með fjölda lífvænlegra frumna.

Hlutfallslegur heildarvöxtur: aukning í frumufjölda á tilteknum tíma í samanburði við samanburðarþýði frumna, reiknað sem margfeldi vaxtar í svifblöndurækt, miðað við neikvæða samanburðinn, margfaldað með klónmyndunarvirkninni miðað við neikvæðan samanburð.

Hlutfallslegur svifblönduvöxtur: aukning í frumufjölda á tjáningartímanum miðað við neikvæða samanburðinn.

Lífvænleiki: klónunarhæfni meðhöndluðu frumnanna við sáningu við valin skilyrði eftir að tjáningartíminn er liðinn.

Lifun: klónunarhæfni meðhöndluðu frumnanna þegar þeim er sáð í lok meðferðartímans; lifun er venjulega gefin upp sem hlutfall af lifun hjá samanburðarfrumuþýðinu.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Frumur, sem skortir týmidínkínasa (TK) í kjölfar stökkbreytingarinnar $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$, eru þolnar gagnvart frumueiturhrifum pýrimídínhliðstæðunnar tríflúortýmidíns (TFT). Frumur með týmidínkínasa eru næmar gagnvart TFT sem hindrar efnaskipti frumna og stöðvar frekari frumuskiptingu. Stökkbreyttar frumur eru því færar um að fjölga sér ef TFT er í umhverfi þeirra en það geta eðlilegar frumur ekki sem eru með týmidínkínasa. Á sama hátt eru frumur, sem skortir HPRT og XPRT, valdar út frá þoli gagnvart 6-þíógúaníni (TG) eða 8-asagúaníni (AG). Eiginleikar prófunarefnisins skulu kannaðir gaumgæfilega ef hliðstæða basans eða efnasamband, sem er skylt valvísa efninu, er notað í einhverri prófun á genastökkbreytingum í spendýrafrumum. Það skal t.d. rannsakað ef einhver grunur vaknar um að prófunarefnið hafi valvís eiturhrif á stökkbreyttu og óbreyttu frumurnar. Því skal staðfesta virkni valvísa kerfisins eða efnisins þegar efni eru prófuð sem eru skyld valvísa efninu að byggingu (8. heimild).

Frumur í svifblöndu- eða einlagsrækt eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í hæfilegan tíma, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar, og afræktaðar til þess að ákvarða frumueiturhrif og láta svipfarstjáningu koma fram áður en stökkbrigðin eru valin (9.–13. heimild). Frumueiturhrif eru að jafnaði ákvörðuð með því að mæla hlutfallslega klónunarhæfni (lifun) eða hlutfallslegan heildarvöxt ræktanna eftir meðhöndlunartímann. Meðhöndluðu ræktirnar eru látnar vera í vaxtarætinu í hæfilegan tíma, sem er miðaður við frumugerðina og genasætið, sem valið er, svo að svipfarstjáning framkallaðra stökkbreytinga verði því sem næst í hámarki. Tíðni stökkbrigða er ákvörðuð með því að sá þekktum fjölda frumna á æti, sem inniheldur valvísa efnið, í því skyni að finna stökkbreyttar frumur og á æti, sem er án valvísa efnisins, til að ákvarða klónunarhæfnina (lífvænleikann). Eftir ræktun í hæfilega langan tíma eru þyrpingarnar taldar. Tíðni stökkbrigða er leitt af fjölda þyrpinga með stökkbreyttum frumum í ætinu með valvísa efninu og fjölda þyrpinga í ætinu sem er ekki með valvísa efninu.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Frumur*

Í þessari prófun má nota margvíslegar frumugerðir, m.a. undirklóna frumugerðanna L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 og TK6. Fyrir skal liggja staðfesting á því að frumugerðirnar, sem notaðar eru í þessari prófun, séu næmar gagnvart efnafræðilegum stökkbreytivöldum, þær hafi mikla klónunarhæfni og hlutfall sjálfsprottinna stökkbrigða sé stöðugt. Gengið skal úr skugga um að frumurnar séu ekki smitaðar berfryningum og ekki skal nota frumur með slíku smiti.

Prófunin skal hönnuð með fyrir fram ákveðnu næmi og styrk. Fjöldi frumna, rækta og mismunandi styrkleika prófunarefnis skal endurspegla þessar fyrir fram skilgreindu mæliþætti (14. heimild). Lágmarksfjöldi lífvænlegra frumna, sem lifir meðhöndlunina af og er notaður á hverju stigi prófunarinnar, er ákveðinn með tilliti til tíðni sjálfsprottinna stökkbreytinga. Almenna viðmiðunarreglan er að nota fjölda frumna sem er a.m.k. tíu sinnum öfuga hlutfallið af tíðni sjálfsprottinna stökkbreytinga. Þó er mælt með því að fjöldinn sé a.m.k. 10^6 frumur. Fyrirliggjandi skulu vera nægileg, rannsóknarsöguleg gögn um frumukerfið til að staðfesta að prófunin gefi ávallt samanburðarnákvæmar niðurstöður.

1.4.1.2. *Æti og ræktunarskilyrði*

Nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (viðeigandi ræktunarílát, hitastig, koltvísýringsstyrk og raka). Velja skal æti í samræmi við valvísu kerfin og frumugerðina sem er notuð í prófuninni. Sérstaklega er mikilvægt að ræktunarskilyrðin séu valin þannig að vöxtur frumna á tjáningartímanum og þyrpingamyndun, bæði stökkbreyttra og óbreyttra frumna, verði í hámarki.

1.4.1.3. *Undirbúningur ræktа*

Frumum úr stofnræktum er fjölgað, þeim sáð á ræktunaræti og þær ræktaðar við 37 °C. Áður en ræktirnar eru notaðar í þessari prófun kann að vera nauðsynlegt að fjarlægja stökkbreyttar frumur sem eru þegar til staðar í ræktunum.

1.4.1.4. *Efnaskiptavirkjun*

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Algengast er að nota kerfi með hjálparþáttabættum hvatberasneyddum frumusafa (S9) sem er unninn úr lifur nagdýra og meðhöndlaður með ensímvirkjum, s.s. Aroclor 1254 (15.–18. heimild), eða samsetningu fenóbarbítóns og β-naptóflavóns (19. og 20. heimild).

Hvatberasneyddi frumusafinn er venjulega notaður í styrk sem er frá 1–10% að rúmmálshlutfalli í síðasta prófunarmiðlinum. Val á efnaskiptavirkjunarkerfi og ástand kerfisins geta ráðist af því úr hvaða flokki efna prófunaríðefnið er. Í sumum tilvikum getur hentað að nota hvatberasneydda frumusafann í meira en einum styrkleika.

Margvíslegar framfarir, m.a. tilkoma erfðabreyttra frumulína sem tjá sérhæfð, virkjandi ensím, kunna að verða þess valdandi að koma megi við innrænni virkjun. Færa skal vísindaleg rök fyrir vali á frumulínunum sem eru notaðar (t.d. með því að sýtókróm-P450-samsætuensím skipti máli fyrir efnaskipti prófunarefnisins).

1.4.1.5. *Undirbúningur prófunarefnis*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Fljótandi prófunarefni má setja beint út í prófunarkerfin og/eða þynna þau fyrir meðferðina. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Ekki má nota leysi eða burðarefni sem grunur leikur á að geti hvarfast við prófunarefnið og leysirinn eða burðarefnið má hvorki skerða lifun frumnanna né S9-virknina. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni. Ef prófuð eru efni sem eru óstöðug í vatni skulu notaðir lífrænir leysar án vatns. Unnt er að fjarlægja vatn með því nota sameindasíu.

1.4.2.2. *Váhrifastyrkleikar*

Þær viðmiðanir, sem líta skal til þegar mesti styrkur er ákveðinn, eru m.a. frumueiturhrif, leysni í prófunarkerfinu og breytingar á sýrustigi eða osmólalstyrk.

Frumueiturhrif skulu ákvörðuð með efnaskiptavirkjun og án hennar í aðaltilrauninni og þar skal styðjast við viðeigandi vísbendingar um heilleika og vöxt frumna, s.s. hlutfallslega klónunarhæfni (lifun) eða hlutfallslegan heildarvöxt. Heppilegt getur verið að ákvarða frumueiturhrif og leysni í fortilraun.

Nota skal a.m.k. fjóra greiningarbæra styrkleika. Ef frumueiturhrifa gætir skal haga þessum styrkleikum þannig að eiturhrifin verði allt frá því að vera í hámarki og niður í það að vera lítil eða engin en að öllu jöfnu merkir þetta að munurinn á styrkleikum skal ekki vera meiri en sem nemur stuðli frá 2 og upp í $\sqrt{10}$. Ef hámarksstyrkurinn grundvallast á frumueiturhrifum ætti hann að leiða til u.þ.b. 10–20% (þó ekki undir 10%) hlutfallslegrar lifunar (hlutfallslegrar klónunarhæfni) eða hlutfallslegs heildarvaxtar. Þegar um er að ræða efni sem eru tiltölulega lítið frumueitrandi skal hámarksprófunarstyrkur vera 5 mg/ml, 5 µl/ml eða 0,01 M, eftir því hvert gildanna er lægst.

Efni, sem eru tiltölulega óleysanleg, skulu prófuð að mörkum leysanleika þeirra eða þar yfir, við skilyrðin í ræktuninni. Staðfesting á óleysanleika skal fengin í þeim miðli sem frumurnar eru látnar komast í snertingu við í lokameðhöndluninni. Gagnlegt getur verið að meta leysnina í upphafi meðhöndlunar og við lok hennar þar eð leysnin getur breyst meðan váhrifa gætir í prófunarkerfinu vegna nærveru frumna, S9, sermis o.s.frv. Unnt er að staðfest óleysanleika með berum augum. Útfellingin má ekki hafa áhrif á matið (e. *scoring*).

1.4.2.3. *Samanburður*

Í hverri tilraun skal vera samskeiða, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Þegar efnaskiptavirkjun er viðhöfð skal íðefnið í jákvæða samanburðinum vera það efni sem krefst virkjunar til að kalla fram stökkbreytandi svörun.

Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Efnaskiptavirkjun	Genasæti	Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
Engin útræn efnaskiptavirkjun	HPRT	etýlmetansúlfónat	62-50-0	200-536-7
		etýlnítrósóúrea	759-73-9	212-072-2
	TK (litlar og stórar þyrpingar)	metýlmetansúlfónat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etýlmetansúlfónat	62-50-0	200-536-7
		Etýlnítrósóúrea	759-73-9	212-072-2
Útræn efnaskiptavirkjun	HPRT	3-metýlkólantren	56-49-5	200-276-4
		N-nítrósódímetýlamín	62-75-9	200-549-8
		7,12-dímetýlbensantrasen	57-97-6	200-359-5
	TK (litlar og stórar þyrpingar)	Sýklófosfamíð	50-18-0	200-015-4
		Sýklófosfamíðmónó-hýdrat	6055-19-2	
		Bensó(a)pýren	50-32-8	200-028-5
		3-metýlkólantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nítrósódímetýlamín (fyrir há gildi á S-9)	62-75-9	200-549-8
		Bensó(a)pýren	50-32-8	200-028-5

Nota má önnur heppileg viðmiðunarefni fyrir jákvæða samanburðinn, t.d. má einnig nota 5-bróm-2'-deoxýúridín (CAS-nr. 59-14-3, Einecs-nr. 200-415-9) ef rannsóknarsögulegur gagnagrunnur er til um það viðmiðunarefni á viðkomandi rannsóknarstofu. Kanna skal hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, ef þau eru tiltæk.

Í prófuninni skal vera neikvæður samanburður sem fær sömu meðhöndlun og hinar ræktirnar en meðhöndlunarmiðillinn skal eingöngu vera leysir eða burðarefni. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn, sem valinn hefur verið, hafi hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

1.4.3. **Verkferli**

1.4.3.1. *Meðferð með prófunarefninu*

Frumur, sem fjölga sér, eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar. Beita skal váhrifum í hæfilegan tíma (venjulega henta þrjár til sex klukkustundir). Váhrifatímann má lengja þannig að hann nái yfir einn eða fleiri frumuhringi.

Fyrir hvern styrkleika, sem er notaður í prófuninni, má nota eina eða tvær meðhöndlaðar ræktir. Ef ein rækt er notuð skal auka fjölda mismunandi styrkleika til að tryggja nægilegan fjölda ræktа til greininga (t.d. a.m.k. átta greiningarbæra styrkleika). Nota skal tvær ræktir við neikvæðan samanburð (leysi).

Loftkennd eða rokgjörn efni skulu prófuð með viðeigandi aðferðum, t.d. í lokuðum ræktunarílátum (21. og 22. heimild).

1.4.3.2. *Mæling á lifun, lífvænleika og hlutfalli stökkbrigða*

Í lok váhrifatímabilsins eru frumurnar þvegnar og ræktaðar til að ákvarða lifun og til að gera þeim kleift að tjá svipgerð stökkbrigðisins. Mæling á frumueiturhrifum er venjulega gerð að loknum meðhöndlunartímanum með því að finna hlutfallslega klónunarhæfni (lifun) eða hlutfallslegan heildarvöxt ræktanna.

Fyrir hvert genasæti er skilgreindur lágmarkstími sem þarf til þess að ná fram því sem næst hámarkstjáningu svipgerðar nýlega framkallaðra stökkbrigða (HPRT og XPRT þurfa a.m.k. 6–8 daga og TK a.m.k. tvo daga). Frumur eru ræktaðar í æti með valvísa efninu eða efnunum eða án þeirra til að ákvarða fjölda stökkbrigða og klónunarhæfni. Mæling á lífvænleika (sem er notaður til að reikna hlutfall stökkbrigða) hefst í lok tjáningartímans með sáningu á almennt æti.

Ef prófunarefnið gefur jákvæðar niðurstöður í prófuninni L5178Y/TK$^{+/-}$ skal stærð þyrpinga ákvörðuð a.m.k. í einni prófunarræktanna (þar sem jákvæður styrkur er mestur) og í neikvæðu og jákvæðu samanburðarræktunum. Ef prófunarefnið gefur neikvæðar niðurstöður í prófuninni L5178Y TK$^{+/-}$ skal stærð þyrpinga ákvörðuð í neikvæðu og jákvæðu samanburðarræktunum. Í rannsóknum, þar sem TK6TK$^{+/-}$ er notað, má einnig ákvarða stærð þyrpinga.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gögn skulu ná yfir ákvörðun á frumueiturhrifum og lífvænleika og yfir fjölda þyrpinga og hlutfall stökkbrigða fyrir meðhöndlaðar ræktir og samanburðarræktir. Ef jákvæð svörun kemur fram í prófuninni L5178Y TK$^{+/-}$ eru þyrpingar metnar með því að nota viðmiðanir fyrir smáar og stórar þyrpingar við a.m.k. einn styrkleika prófunarefnisins (mesta, jákvæða styrk) og neikvæða og jákvæða samanburðinn. Sameindafræðilegt og frumuerfðafræðilegt eðli stökkbrigða, bæði í stórum og smáum þyrpingum, hefur verið rannsakað í smáatriðum (23. og 24. heimild). Í prófuninni TK$^{+/-}$ eru þyrpingar metnar út frá viðmiðunum fyrir eðlilegan vöxt (stórar) og hægan vöxt (smáar) þyrpinga. Stökkbreyttar frumur, sem hafa orðið fyrir víðtækustu erfðabreytingunum, fjölga sér hægar en hinar og mynda því smáar þyrpingar. Umfang þessa skaða er að jafnaði á kvarðanum frá því að missa heilt gen og upp í litningabreytingar sem koma fram í breyttri kjarngerð. Framköllun stökkbrigða, sem mynda smáar þyrpingar, hefur verið tengd íðefnum sem kalla fram umfangsmiklar litningabreytingar (26. heimild). Stökkbreyttar frumur með síður alvarlegum breytingum vaxa ámóta hratt og móðurfrumurnar og mynda stórar þyrpingar.

Tilgreina skal lifun (hlutfallslega klónunarhæfni) eða hlutfallslegan heildarvöxt. Tíðni stökkbrigða skal gefin upp sem fjöldi stökkbreyttra frumna á móti fjölda eftirlifandi frumna.

Skrá skal gögn um hverja rækt fyrir sig. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu.

Ekki er gerð krafa um sannprófun á skýrri, jákvæðri svörun. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum. Ef niðurstöður eru neikvæðar þarf að staðfesta þær í hverju tilviki um sig. Sé ekki talin þörf á því að staðfesta neikvæðar niðurstöður skal færa rök fyrir því. Ef niðurstöðurnar eru óvissar eða neikvæðar skal í eftirfylgnitilraunum vega og meta hvort breyta skuli mæliþáttum rannsóknarinnar til að víkka svið tilraunaskilyrðanna sem matið tekur til. Meðal þátta í rannsókninni, sem kemur til álita að breyta, er bilið milli skammtastyrkleika og skilyrðin við efnaskiptavirkjunina.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. styrktengd aukning eða samanburðarnákvæm aukning í tíðni stökkbrigða. Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum. Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð.

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessu kerfi.

Þótt niðurstöður úr flestum rannsóknum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður úr prófun í glasi á genastökkbreytingum í spendýrafrumum benda til þess að prófunarefnið kalli fram genastökkbreytingar í ræktuðu spendýrafrumunum sem eru notaðar í prófuninni. Jákvæð, samanburðarnákvæm svörun, sem er háð styrk, skiptir mestu máli. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram genastökkbreytingar í ræktuðu spendýrafrumunum sem eru notaðar í prófuninni.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni eða leysi,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Frumur:

— gerð og uppruni frumna,

— fjöldi frumuræktа,

— fjöldi frumuumsáninga, ef við á,

— aðferðir til að viðhalda frumurækt, ef við á,

— upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á þeim styrkleikum og fjölda ræktа sem eru notuð, t.d. gögn um frumueiturhrif og takmarkanir á leysni, ef við á.

— samsetning ræktunarætis og styrkur koltvísýrings,

— styrkur prófunarefnisins,

— rúmmál burðarefnis og prófunarefnis sem er bætt við,

— ræktunarhiti,

— ræktunartími,

— lengd meðferðartíma,

— þéttleiki frumna við meðferð,

— tegund og samsetning efnaskiptavirkjunarkerfis, m.a. viðmiðanir fyrir ásættanleika,

— jákvæður og neikvæður samanburður,

— lengd tjáningartíma (m.a. fjöldi frumna sem er sáð, undirræktir og áætlanir um næringargjöf, ef við á),

— valvís efni,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar,

— aðferðir sem eru notaðar til að finna fjölda lífvænlegra og stökkbreyttra frumna,

— skilgreining á þyrpingum þar sem stærð og gerð eru lögð til grundvallar (m.a. viðmiðanir fyrir „smáar“ og „stórar“ þyrpingar, eftir því sem við á).

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif,

— merki um útfellingu,

— gögn um sýrustig og osmólalstyrk meðan á váhrifum frá prófunarefninu stendur, ef þessir þættir eru mældir,

— stærð þyrpinganna, ef hún er metin, a.m.k. fyrir neikvæðan og jákvæðan samanburð,

— hæfni rannsóknarstofunnar til að greina stökkbrigði í smáum þyrpingum með L5178Y $TK^{+/-}$-kerfinu ef við á.

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef um þær er að ræða,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— hlutfall stökkbrigða.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.), (1987) Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V., (1968) Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, bls. 1306-1312.

3) Liber, H.L. and Thilly, W.G., (1982) Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, bls. 467-485.

4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L., (1989) Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, bls. 394-403.

5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F., (1989) Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, bls. 121-128.

6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E., (1994) Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, bls. 235-239.

7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C., (1991) Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, bls. 147-204.

8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H., (1983) Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, bls. 225-251.

9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, J.S., (1988) A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, bls. 17-36.

10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L., (1987) A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, bls. 135-141.

11) Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B., (1989) A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, bls. 9-17.

12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W., (1986) Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, bls. 133-147.

13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D., (1984) Procedures for the L5178Y/TK+/- — TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, bls. 239-268.

14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C., (1989) Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, bls. 66-101.

15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A., (1977) Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, bls. 365-373.

16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., (1975) Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, bls. 347-364.

17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M., (1979) Validation and Characterisation of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, bls. 61-108.

18) Maron, D.M. and Ames, B.N., (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, bls. 173-215.

19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C., (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 175-177.

20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T., (1976) A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, bls. 85-88.

21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T., (1982) CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, bls. 91-103.

22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L., (1983) Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT

Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, bls. 795-801.

23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C., (1990) Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, bls. 51-55.

24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J., (1985) Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, bls. 161-174.

25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B., (1990) Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229, bls. 89-102.

26) Moore, M.M. and Doerr, C.L., (1990) Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, bls. 609-614.

B.18. DNA-SKEMMD OG DNA-VIÐGERÐ — ÓFYRIRSÉÐ DNA-NÝMYNDUN — SPENDÝRAFRUMUR Í GLASI

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Í prófun á ófyrirséðri DNA-nýmyndun er viðgerðarnýmyndun á DNA mæld eftir að DNA-bútur með skemmd, sem var framkölluð með efna- eða eðlisfræðilegum áhrifavöldum, hefur verið skorinn burt og fjarlægður. Prófunin byggist á upptöku (e. *incorporation*) á trítíum-merktu týmidíni (^{3}H-TdR) inn í DNA spendýrafrumna sem eru ekki í S-fasa frumuhringsins. Upptöku á ^{3}H-TdR má ákvarða með eigingeislamyndatöku eða með sindurtalningu í vökva á DNA úr meðhöndluðu frumunum. Spendýrafrumur í ræktun eru meðhöndlaðar með prófunarefninu með útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess nema notaðar séu frumræktir með lifrarfrumum úr rottum. Ófyrirséða DNA-nýmyndun má einnig mæla með kerfum til prófunar í lífi.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Prófunaríðefnin og samanburðar- eða viðmiðunarefni eru sett í vaxtaræti eða leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi burðarefnum og síðan þynnt enn frekar í vaxtarætinu fyrir notkun í prófuninni. Lokastyrkur burðarefnis má ekki hafa áhrif á lífvænleika frumna.

Í prófuninni má nota frumræktir lifrarfrumna úr rottum, eitilfrumna manna eða skilgreindra frumulína (t.d. tvílitna trefjakímfrumna úr mönnum).

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess.

Prófunarskilyrði

Fjöldi ræktа

Fyrir hvern tilraunaþátt þarf a.m.k. tvær frumuræktir fyrir eigingeislamyndatöku og sex ræktir (eða færri ef fyrir því eru vísindaleg rök) fyrir sindurtalningu í vökva.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Í hverri tilraun skal vera samskeiða, jákvæður samanburður og neikvæður (ómeðhöndlaður og/eða með burðarefni) samanburður, bæði með efnaskiptavirkjun og án hennar.

Dæmi um jákvæð samanburðarefni fyrir prófun með rottulifrarfrumum eru t.d. 7,12-dímetýlbensantrasen (7,12-DMBA) eða 2-asetýlamínóflúoren (2-AAF). Þegar um er að ræða skilgreindar frumulínur má t.d. nota 4-nítrókínólín-N-oxíð (4-NQO) við jákvæðan samanburð, bæði fyrir prófanir með eigingeislamyndatöku og með sindurtalningu í vökva sem gerðar eru án efnaskiptavirkjunar, N-dímetýlnítrósamín má t.d. nota við jákvæðan samanburð þegar efnaskiptavirkjunarkerfi eru notuð.

Váhrifastyrkleikar

Nota skal nokkra mismunandi styrkleika af prófunarefninu á bili sem nægir til að skilgreina svörunina. Mesti styrkur ætti að valda einhverjum frumudrepandi áhrifum. Efnasambönd með hlutfallslega litla vatnsleysni skal prófa upp að leysnimörkum. Ákvarða skal efri styrkmörk í hverju tilviki fyrir sig þegar um er að ræða óeitruð efni sem eru auðleyst í vatni.

Frumur

Til að viðhalda frumum í rækt skal nota viðeigandi vaxtaræti, koltvísýringsstyrk, hitastig og raka. Kanna skal reglulega hvort skilgreindar frumulínur séu smitaðar af berfrymingum.

Efnaskiptavirkjun

Ekki er notað efnaskiptavirkjunarkerfi í sambandi við frumræktun lifrarfrumna. Skilgreindar frumulínur og eitilfrumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess.

Verkferli

Undirbúningur ræktа

Skilgreindar frumulínur eru fengnar úr stofnræktum (t.d. með því að losa þær með trypsíni (e. *trypsinisation*) eða með því að hrista þær af) og þeim er sáð hæfilega þétt í ræktunarílát og þær ræktaðar við 37 °C.

Skammtímaræktir lifrarfrumna úr rottum eru staðfestar með því að láta lifrarfrumurnar í hæfilegt æti strax eftir aðskilnað og láta þær festa sig við yfirborðið þar sem vöxtur fer fram.

Ræktir eitilfrumna úr mönnum eru útbúnar með viðeigandi tækni.

Meðferð ræktа með prófunarefninu

Frumræktir með lifrarfrumum úr rottum

Nýlega einangraðar lifrarfrumur úr rottum eru meðhöndlaðar með prófunarefninu í hæfilega langan tíma í æti sem inniheldur ^{3}H-TdR. Í lok meðhöndlunartímans er ætið fjarlægt og frumurnar skolaðar, festar og þurrkaðar. Sýnisglerjum skal dýfa í ljósnæmilag til eigingeislamyndatöku (einnig má nota álímda filmu (e. *stripping film*)) og þau skulu því næst lýst, framkölluð, lituð og metin.

Skilgreindar frumulínur og eitilfrumur

Aðferðir við eigingeislamyndatöku (e. *audioradiographic techniques*): frumuræktir eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu hæfilega lengi og síðan eru þær meðhöndlaðar með ^{3}H-TdR. Tímalengdin stjórnast af eiginleikum efnisins, virkni efnaskiptakerfana og tegund frumna. Til að greina hámark ófyrirséðrar DNA-nýmyndunar skal bæta ^{3}H-TdR við samtímis prófunarefninu eða innan fárra mínútna frá því að frumurnar voru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu. Val milli þessara tveggja verkferla ræðst af hættunni á víxlverkunum milli prófunarefnisins og ^{3}H-TdR. Mögulegt er að greina á milli ófyrirséðrar DNA-nýmyndunar og hálfgeyminnar DNA-eftirmyndunar með því að hindra það síðarnefnda, t.d. með því að nota arginínsnautt æti, lágt sermisinnihald eða með hýdroxýúreu í ræktunarætinu.

Mælingar á ófyrirséðri DNA nýmyndun með sindurtalningu í vökva: fyrir meðhöndlun með prófunarefninu er komið í veg fyrir að frumurnar komist í S-fasa eins og lýst var hér á undan; frumurnar skulu síðan látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu á sama hátt og við eigingeislamyndatöku. Í lok ræktunartímans er DNA skilið frá frumunum og heildarinnihald DNA og umfang ^{3}H-TdR-upptökunnar ákvarðað.

Hafa skal í huga að þegar ofangreindar aðferðir eru notaðar á eitilfrumur úr mönnum er óþarfi að bæla hálfgeymna DNA-eftirmyndun í óörvuðum ræktum.

Greining

Ákvarðanir með eigingeislamyndatöku

Við ákvörðun á ófyrirséðri DNA-nýmyndun í frumum í rækt eru kjarnar í S-fasa ekki taldir með. Telja skal minnst 50 frumur fyrir hvern styrkleika. Sýnisgler skulu kóðuð fyrir talningu. Telja skal nokkur vel aðskilin, slembivalin svæði á hverju sýnisgleri. Magn ^{3}H-TdR-upptöku í umfrymið er ákvarðað með talningu á þremur svæðum, sem hvert um sig eru á stærð við kjarna, í umfrymi hverrar frumu sem er talin.

Greiningar með sindurtalningu í vökva

Nota skal hæfilegan fjölda rækta fyrir hvern styrkleika og samanburð við ákvarðanir á ófyrirséðri DNA-nýmyndun með sindurtalningu í vökva.

Allar niðurstöður skulu staðfestar með óháðri tilraun.

2. GÖGN

Gögn skulu sett fram í töfluformi.

2.1. ÁKVARÐANIR MEÐ EIGINGEISLAMYNDATÖKU

Magn ^{3}H-TdR-upptöku í umfrymið og fjölda korna, sem fundust í frumukjarna, skal skráð hvort fyrir sig.

Dreifingu þessa magns af ^{3}H-TdR, sem hefur verið tekið upp í umfrymið, og fjölda korna í hverjum kjarna má lýsa með meðaltali, miðgildi og algengasta gildi.

2.2. ÁKVARÐANIR MEÐ SINDURTALNINGU Í VÖKVA

Fyrir ákvarðanir með vökvasindurtalningu skal skrá ^{3}H-TdR-upptöku sem sundrun á mínútu/µg DNA. Nota má meðalsundrun á mínútu/µg DNA ásamt staðalfráviki til að lýsa dreifingu upptökunnar í umfryminu.

Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— frumurnar, sem voru notaðar, þéttleiki, umsáningartala á meðferðartíma og fjöldi frumuræktа,

— aðferðir sem voru notaðar til að halda frumuræktunum við, þ.m.t. æti, hitastig og styrkur koltvísýrings,

— prófunarefni, burðarefni, styrkleikar og rökstuðningur fyrir vali á styrkleikum sem notaðir voru í greiningunni,

— ítarlegar upplýsingar um efnaskiptavirkjunarkerfin,

— meðferðaráætlun,

— jákvæður og neikvæður samanburður,

— aðferð sem var notuð við eigingeislamyndatöku,

— verkferlin sem voru notuð til að hindra að frumur fari í S-fasa,

— verkferli, sem voru notuð við ákvörðun með sindurtalningu í vökva, til að einangra DNA og ákvarða samanlagt DNA-innihald,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.19. PRÓFUN Í GLASI Á VÍXLUN SYSTURLITNINGSÞRÁÐA

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófun á víxlun systurlitningsþráða er skammtímaprófun sem er notuð til að greina gagnkvæma víxlun á DNA milli tveggja systurlitningsþráða í litningi þegar tvöföldun fer fram. Við víxlun systurlitningsþráða verður víxlun á DNA-tvöföldunarafurðum á, að því er virðist, samsvarandi gensetum. Víxlunarferlið felur sennilega í sér að DNA-keðjur rofna og tengjast síðan aftur þótt lítið sé vitað um sameindagrunn ferlisins. Til að unnt sé að greina víxlun systurlitningsþráða er nauðsynlegt að merkja systurlitningsþræðina til aðgreiningar og það má gera með innfellingu á brómódeoxýúridíni (BrdU) í DNA litninganna í gegnum tvo frumuhringi.

Spendýrafrumur í glasi eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu með og án útræns efnaskiptavirkjunarkerfís úr spendýri, ef við á, og eru síðan ræktaðar í tvo eftirmyndunarhringi í æti sem inniheldur brómódeoxýúridín. Eftir meðhöndlun með spólutálma (t.d. kolsisíni) til að fjölga frumum sem eru í ástandi sem næst miðfasa jafnskiptingar (c-miðfasa) er frumunum safnað og þær undirbúnar fyrir litningarannsókn.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Undirbúningur*

— Í prófuninni má nota frumræktir (með lifrarfrumum manna) eða skilgreindar frumulínur (t.d. eggjastokkafrumur úr kínverskum hömstrum). Kanna skal hvort frumulínurnar séu smitaðar af berfrymingum,

— nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði (viðeigandi hitastig, ræktunarílát, koltvísýringsstyrk og raka),

— prófunarefni má tilreiða í ræktunaræti eða leysa þau upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í viðeigandi burðarefni áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Endanlegur styrkur burðarefnis í ræktunarkerfinu má ekki hafa umtalsverð áhrif á lífvænleika eða vaxtarhraða frumna og vakta skal áhrif burðarefnisins á víxlunartíðni systurlitningsþráða með samanburðarræktun með leysi,

— frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með útrænu efnaskiptavirkjunarkerfi spendýra og án þess. Ef notaðar eru frumugerðir með eigin efnaskiptavirkjun skulu hraði og eðli virkjunarinnar hæfa þeim efnaflokki sem verið er að prófa.

1.6.2. *Prófunarskilyrði*

Fjöldi ræktа

Nota skal minnst tvær samhliða ræktir fyrir hvern tilraunarþátt.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Í hverri tilraun skal vera jákvæður samanburður, þar sem notað er bæði beinvirkt efnasamband og efnasamband sem útheimtir efnaskiptavirkjun, einnig skal nota samanburð með burðarefni.

Eftirfarandi eru dæmi um efni sem nota mætti sem jákvæðan samanburð:

— beinvirkt efnasamband:

  — etýlmetansúlfónat,

— efnasamband sem virkar óbeint:

  — sýklófosfamíð.

Þegar við á má gera frekari jákvæðan samanburð með íðefni úr sama efnaflokki og íðefnið sem verið er að prófa.

Váhrifastyrkleikar

Nota skal minnst þrjá mismunandi styrkleika af prófunarefninu með hæfilegum mun á styrkleikum. Mesti styrkur ætti að kalla fram marktæk eiturhrif en má þó ekki hindra nauðsynlega frumuskiptingu. Efni með hlutfallslega litla vatnsleysni skal prófa upp að leysnimörkum með viðeigandi verkferlum. Ákvarða skal efri styrkmörk í hverju tilviki fyrir sig þegar um er að ræða óeitruð efni sem eru auðleyst í vatni.

1.6.3. Verkferli

Undirbúningur ræktа

Skilgreindar frumulínur eru fengnar úr stofnræktum (t.d. með því að losa þær með trypsíni eða með því að hrista þær af) og þeim er sáð hæfilega þétt í ætisílát og þær ræktaðar við 37 °C. Ef um er að ræða einlaga ræktir skal stilla fjölda frumna í hverju ræktunaríláti þannig að samrennsli í ræktunum sé í mesta lagi 50% þegar þeim er safnað. Einnig má nota frumur ræktaðar í svifblöndu. Ræktir eitilfrumna úr mönnum eru útbúnar úr heparínmeðhöndluðu blóði með viðeigandi tækni og ræktaðar við 37 °C.

Meðhöndlun

Frumur á veldisvaxtarstigi eru látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í hæfilega langan tíma, í flestum tilfellum nægja ein til tvær klukkustundir en meðhöndlunartímann má framlengja í allt að tvo heila frumuhringi í tilteknum tilvikum. Frumur, sem hafa ekki nægilega eigin efnaskiptavirkjun, skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Í lok váhrifatímabilsins er prófunarefnið þvegið af frumunum og þær ræktaðar í gegnum tvo frumuhringi í viðurvist brómódeoxýúridíns (BrdU). Önnur aðferð er að láta frumurnar verða fyrir váhrifum frá prófunaríðefninu og brómódeoxýúridíni samtímis á ræktunartímabili sem nemur tveimur heilum frumuhringjum.

Ræktir eitilfrumna úr mönnum eru meðhöndlaður meðan þær eru nokkurn veginn í samstilltu ástandi.

Greining á frumum fer fram í annarri skiptingu þeirra eftir meðhöndlun svo að tryggt sé að þær verði fyrir váhrifum frá íðefninu á viðkvæmustu stigum frumuhringsins. Allar ræktir með viðbættu brómódeoxýúridíni ber að meðhöndla í myrkri eða í daufu ljósi frá glóðarperu, þar til frumunum er safnað, til að lágmarka ljósrof DNA sem inniheldur brómódeoxýúridín.

Söfnun frumna

Frumuræktir eru meðhöndlaðar með spólutálma (t.d. kolsisíni) einni til fjórum klukkustundum áður en þær eru heimtar. Hver frumurækt er heimt og meðhöndluð sérstaklega þegar kemur að undirbúningi litninga.

Undirbúningur og litun litninga

Við undirbúning litninga eru notaðar staðlaðar, frumuerfðafræðilegar aðferðir. Litun á sýnisglerjum til að sýna víxlun systurlitningsþráða má gera á ýmsan hátt (t.d. með aðferðinni með flúrljómun ásamt Giemsa-litun).

Greining

Fjöldi frumna, sem eru greindar, skal grundvallast á sjálfkrafa víxlunartíðni systurlitningsþráða í samanburðarrannsókn. Venjulega eru minnst 25 vel dreifðir miðfasar í hverri rækt greindir með tilliti til víxlunar systurlitningsþráða. Sýnisgler eru kóðuð fyrir greiningu. Við greiningu á eitilfrumum úr mönnum eru aðeins greindir miðfasar með 46 þráðhöftum. Í skilgreindum frumulínum eru aðeins greindir miðfasar sem hafa ± 2 þráðhöft miðað við algengasta gildið. Taka skal fram hvort víxlun á merkjum við þráðhaftið sé talin sem víxlun systurlitningsþráða. Allar niðurstöður skulu staðfestar með óháðri tilraun.

2. GÖGN

Gögn skulu sett fram í töfluformi Greina ætti sérstaklega frá fjölda systurlitningsþráðavíxlana fyrir hvern miðfasa og fjölda systurlitningsþráðavíxlana fyrir hvern litning hjá öllum meðhöndluðum ræktum og samanburðarræktum.

Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— frumurnar sem voru notaðar og aðferðir til að halda frumuræktunum við,

— prófunarskilyrði: samsetning ætis, styrkur koltvísýrings, styrkur prófunarefnis, burðarefnið sem var notað, ræktunarhiti, meðferðartími, spólutálminn auk upplýsinga um styrk hans og lengd meðferðar með honum, tegund efnaskiptavirkjunarkerfisins úr spendýri sem var notað og jákvæður og neikvæður samanburður,

— fjöldi frumuræktа í hverjum tilraunaþætti,

— upplýsingar um aðferðina sem var notuð við undirbúning sýnisglerja,

— fjöldi miðfasa sem voru greindir (gefa skal upplýsingar um hverja rækt fyrir hverja sig),

— meðalfjöldi systurlitningsþráðavíxlana fyrir hverja frumu og hvern litning (gefa skal upplýsingar um hverja rækt fyrir hverja sig),

— viðmiðanir fyrir mat á systurlitningsþráðavíxlunum,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef við á,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.20. **PRÓFUN Á KYNBUNDNUM, VÍKJANDI BANAGENUM HJÁ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLUR PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Með prófun á kynbundnum, víkjandi banagenum, þar sem *Drosophila melanogaster* er notuð, má greina stökkbreytingar í kímlínu skordýrsins, bæði punktbreytingar og litlar úrfellingar. Hér er um frumstökkbreytingarprófun að ræða þar sem unnt er að skima fyrir stökkbreytingum á u.þ.b. 800 setum á X-litningnum, sem er um 80% af öllum setum á X-litningnum. X-litningurinn er u.þ.b. einn fimmti af öllu einlitna genamenginu.

Stökkbreytingar á X-litningi *Drosophila melanogaster* eru tjáð í svipgerð karldýra sem bera stökkbreytta genið. Þegar stökkbreytingin er banvæn við arfstakar aðstæður er ályktað um tilvist hennar út frá því að það vantar aðra af þeim tveimur gerðum karldýra sem venjulega finnast meðal afkvæma arfblendinna kvendýra. Með kynbundinni, víkjandi banaprófun er þetta samband nýtt með sérstaklega merktum og röðuðum litningum.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Stofnar

Nota má karldýr af vel skilgreindri villigerð og kvendýr úr Muller-5- stofninum. Einnig má nota kvendýr úr öðrum stofnum með viðeigandi merkingum og margumhverfðum X-litningum.

Prófunarefni

Prófunarefni skal leysa upp í vatni. Efni sem eru ekki vatnsleysanleg má leysa upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í viðeigandi burðarefni (t.d. blöndu af etanóli og Tween-60 eða -80), sem síðan er þynnt með vatni eða saltlausn fyrir gjöf. Varast skal að nota dímetýlsúlfoxíð (DMSO) sem burðarefni.

Fjöldi dýra

Prófunin skal hönnuð með fyrir fram ákveðnu næmi og styrk. Tíðni sjálfsprottinna stökkbrigða, sem fundin er með viðeigandi samanburðarrannsókn, ræður miklu um hversu marga meðhöndlaða litninga þarf að greina.

Íkomuleið

Váhrif geta verið um munn eða með innsprautun eða váhrif frá gasi eða gufum. Gefa má prófunarefnið í sykurlausn. Ef nauðsyn krefur má leysa efnin upp í 0,7% NaCl-lausn og sprauta henni í brjósthol eða kvið.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Neikvæður (burðarefni) og jákvæður samanburður skal vera hluti af prófuninni. Ef viðeigandi, rannsóknarsöguleg samanburðargögn eru tiltæk er samskeiða samanburður þó óþarfur.

Váhrifastig

Nota skal þrjú váhrifastig. Við frummat má nota prófunarefnið á einu váhrifastigi sem þarf að vera annaðhvort mesti styrkur sem dýrin þola eða styrkur sem framkallar einhver merki um eiturhrif. Þegar um er að ræða óeitruð efni skulu váhrifin vera af mestum mögulegum styrk.

Verkferli

Karldýr af villigerð (þriggja til fimm daga gömul) eru meðhöndluð með prófunarefninu og hvert og eitt látið maka sig með ofgnótt af óspjölluðum kvendýrum af Muller-5-stofni eða öðrum stofni með viðeigandi merkingum (með margumhverfðum X-litningum). Kvendýrunum er skipt út annan eða þriðja hvern dag með nýjum, óspjölluðum kvendýrum til að ná yfir allan kímfrumuhringinn. Metin eru banvæn áhrif hjá afkvæmum þessara kvendýra sem svara til áhrifa á þroskaðar sáðfrumur, forsæðisfrumur á miðstigi eða seinna stigi, forsæðisfrumur á fyrsta stigi, sáðfrumuvísa og sáðstofnfrumur.

Arfblendin F_1-kvendýr úr framangreindum kynblöndunum eru hvert um sig látin maka sig (þ.e. eitt kvendýr í hverju glasi) við bræður sína. Í F_2-kynslóðinni er metið, fyrir hverja ræktun um sig, hvort karldýr af villigerð vanti. Ef rækt virðist vera komin af F_1-kvendýri sem ber banagen á X-litningi foreldris (þ.e. engin karldýr með meðhöndlaða litninginn koma fram) skal gera prófun á dætrum þessa kvendýrs, sem hafa sömu arfgerð, til að ganga úr skugga um hvort banvæn áhrif komi fram í næstu kynslóð.

2. GÖGN

Gögn skulu sett fram í töfluformi til að sýna fjölda prófaðra X-litninga, fjölda ófrjórra karldýra og fjölda banalitninga fyrir hvern váhrifastyrk og fyrir hvert pörunartímabil hjá hverju meðhöndluðu karldýri. Fjöldi klasa af mismunandi stærðum skal skráður fyrir hvert karldýr. Niðurstöðurnar skulu staðfestar með sérstakri tilraun.

Nota skal viðeigandi tölfræðiaðferðir við mat á prófunum á kynbundnum, víkjandi banagenum. Í tilvikum, þar sem banagen, sem eru upprunnin hjá einu karldýri, mynda klasa skal taka það til athugunar og meta það með viðeigandi tölfræðiaðferð.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— stofn: *Drosophila*-stofnar sem notaðir voru, aldur skordýranna, fjöldi meðhöndlaðra karldýra, fjöldi ófrjórra karldýra, fjöldi F_2-ræktа sem stofnað var til, fjöldi F_2-ræktа án afkvæma og fjöldi litninga með banagen á hverju kímfrumustigi,

— viðmiðanir fyrir ákvörðun á stærð meðferðarhópa,

— prófunarskilyrði: ítarleg lýsing á meðhöndlunar- og sýnatökuáætlunum, váhrifastig, gögn um eiturhrif og neikvæður (leysir) og jákvæður samanburður ef við á,

— viðmiðanir fyrir mat á banvænum stökkbreytingum,

— sambandið milli váhrifa og verkunar ef unnt er,

— mat á gögnum,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.21. **PRÓFANIR Í GLASI Á UMMYNDUN SPENDÝRAFRUMNA**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nota má ræktir með spendýrafrumum til að greina svipgerðarbreytingar í glasi af völdum hreinna efna sem tengjast illkynja ummyndun í lífi. Frumur, sem algengt er að nota, eru m.a. C3H10T$^{1/2}$, 3T3, SHE og Fischer-rotta og prófanirnar byggjast á breytingum á formi og byggingu frumna, þyrpingamyndun eða breytingum á festihæði í hálfföstu agaræti. Til eru minna notuð kerfi sem greina aðrar lífeðlisfræðilegar eða formfræðilegar breytingar í frumum sem verða í kjölfarið á váhrifum frá krabbameinsvaldandi efnum. Ekki hefur verið sýnt fram á orsakasamband, að því er varðar verkunarhátt, milli endapuntkanna í þessum prófunum í glasi og krabbameins. Sum prófunarkerfanna geta greint æxlisefla. Frumueiturhrif má ákvarða með því að mæla áhrif prófunarefnisins á hæfni til þyrpingamyndunar (einræktunarvirkni) eða vaxtarhraða ræktanna. Tilgangurinn með mælingum á frumueiturhrifum er að sýna fram á að váhrif frá prófunarefninu hafi verið eiturefnafræðilega marktæk en geti ekki nýst til að reikna út tíðni ummyndunar í öllum prófunum þar eð í sumum þeirra kunni að þurfa lengdan ræktunartíma og/eða endursáningu (e. *replating*).

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Frumur

Hægt er að velja úr mörgum mismunandi frumulínum eða fyrsta stigs frumum eftir því hvaða ummyndunarprófun er verið að gera. Rannsakandinn verður að sjá til þess að frumurnar í prófuninni sýni viðeigandi svipfarsbreytingar eftir váhrif frá þekktum krabbameinsvöldum og að sýnt sé fram á og skjalfest að prófunin, sem fram fer á rannsóknarstofu hans, sé gild og áreiðanleg.

Æti

Nota skal æti og tilraunaskilyrði sem henta fyrir ummyndunarprófunina sem gerð er.

Prófunarefni

Prófunarefni má tilreiða í ræktunaræti eða leysa þau upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í heppilegum burðarefnum áður en frumurnar eru meðhöndlaðar. Endanlegur styrkur burðarefnisins í ræktunarkerfinu skal ekki hafa áhrif á lífvænleika frumnanna, vaxtarhraða eða tíðni ummyndunar.

Efnaskiptavirkni

Frumur skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Þegar notaðar eru frumugerðir með innri efnaskiptavirkni þarf hins vegar að liggja fyrir að eðli virkninnar henti fyrir þann flokk efna sem verið er að prófa.

Prófunarskilyrði

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Í hverri tilraun skal nota jákvæðan samanburð, bæði með beinvirku efnasambandi og efnasambandi sem þarf efnaskiptavirkjun, og einnig skal nota neikvæðan (burðarefni) samanburð.

Eftirfarandi eru dæmi um efni sem nota mætti sem jákvæðan samanburð:

— Beinvirk íðefni:

  — etýlmetansúlfónat,

  — β-própíólaktón

— Efnasambönd sem þurfa efnaskiptavirkjun:

  — 2-asetýlamínóflúoren,

  — 4-dímetýlamínóasóbensen,

  — 7,12-dímetýlbensantrasen.

Þegar við á skal auk þess gera jákvæðan samanburð með efnasambandi úr sama efnaflokki og efnasambandið sem verið er að prófa.

Váhrifastyrkleikar

Nota skal nokkra mismunandi styrkleika af prófunarefninu. Þessir styrkleikar skulu valda styrktengdum eiturhrifum þar sem mesti styrkurinn á að framkalla lágt lifunarstig og lifun við lægsta styrk á að vera u.þ.b. sú sama og í neikvæða samanburðinum. Efni með hlutfallslega litla vatnsleysni skal prófa upp að leysnimörkum með viðeigandi verkferlum. Ákvarða skal efri styrkmörk í hverju tilviki fyrir sig þegar um er að ræða óeitruð efni sem eru auðleyst í vatni.

Verkferli

Frumurnar skulu látnar verða fyrir váhrifum hæfilega lengi, eftir því hvaða prófunarkerfi er notað, en það getur falið í sér endurskömmtun ásamt því að skipt sé um æti (og, ef nauðsyn krefur, ferska efnaskiptavirkjunarblöndu), ef um langvarandi váhrif er að ræða. Frumur, sem hafa ekki fullnægjandi innri efnaskiptavirkjun, skulu látnar verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, bæði með viðeigandi efnaskiptavirkjunarkerfi og án þess. Í lok váhrifatímabilsins er prófunarefnið þvegið af frumunum og þær ræktaðar við viðeigandi skilyrði til að ummyndaða svipfarið, sem verið er að vakta, komi fram og til að ákvarða tíðni ummyndunar. Allar niðurstöður skal staðfesta með óháðri tilraun.

2. GÖGN

Gögn skal setja fram í töfluformi og geta þau verið mismunandi eftir prófuninni sem er gerð, t.d. líftölur, fjöldi jákvæðra skála eða fjöldi ummyndaðra frumna. Eftir því sem við á skal sýna lifun sem hundraðshluta lifunar í samanburðarprófunum og tíðni ummyndunar sem fjölda ummyndaðra frumna miðað við fjölda eftirlifandi frumna. Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— frumugerðin sem er notuð, fjöldi frumuræktа og aðferðir til að halda frumuræktunum við,

— prófunarskilyrði: styrkur prófunarefnisins, burðarefnið sem er notað, ræktunartími, lengd og tíðni meðferðar, frumuþéttleiki við meðferð, tegund útræna efnaskiptavirkjunarkerfisins sem er notað, jákvæður og neikvæður samanburður, nákvæm lýsing á svipfarinu sem er vaktað, valkerfi sem er notað (ef við á) og rökstuðningur fyrir skammtavali,

— hvaða aðferð er notuð til að finna fjölda lífvænlegra og ummyndaðra frumna,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.22. PRÓFUN Á RÍKJANDI BANAGENUM HJÁ NAGDÝRUM

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ríkjandi, banvæn áhrif leiða til dauða fósturvísis eða fósturs. Ef ríkjandi banagen koma fram við váhrif frá tilteknu efni bendir það til þess að efnið hafi haft áhrif á kímvef prófunartegundarinnar. Það er almennt viðurkennt að ríkjandi banagen stafi af litningaskemmdum (byggingarlegum og tölulegum afbrigðum). Ef kvendýr verða fyrir fósturvísisláti eftir meðhöndlun getur það einnig stafað af eiturhrifum.

Venjulega eru karldýr látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu og pöruð við ómeðhöndluð, óspjölluð kvendýr. Hægt er að prófa hin ýmsu kímfrumustig hvert fyrir sig með því að nota raðbundin pörunartímabil. Fjölgun dauðra fanga á hvert kvendýr í meðferðarhópnum, miðað við fjölda dauðra fanga á hvert kvendýr í samanburðarhópnum, endurspeglar fanglát eftir hreiðrun. Hægt er að meta fanglát fyrir hreiðrun eftir fjölda gulbúa eða með því að bera saman heildarfjölda fanga á hvert kvendýr í meðferðar- og samanburðarhópunum. Samanlögð ríkjandi, banvæn áhrif samsvara samanlögðum fanglátum fyrir og eftir hreiðrun. Útreikningur á samanlögðum ríkjandi, banvænum áhrifum byggist á samanburði á fjölda lifandi fanga á hvert kvendýr í prófunarhópnum og fjölda lifandi fanga á hvert kvendýr í samanburðarhópnum. Fækkun hreiðraðra fanga á tilteknum tímabilum getur stafað af frumudrápi (á sáðfrumuvísum og/eða sáðstofnfrumum).

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Ef hægt er skal leysa prófunarefnin upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í jafnþrýstinni saltlausn. Íðefni, sem eru ekki vatnsleysanleg, má leysa upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í heppilegu burðarefni. Burðarefnið, sem er notað, má hvorki trufla verkun prófunarefnisins né valda eiturhrifum. Nota skal ferska blöndu af prófunarefninu.

Prófunarskilyrði

Íkomuleið

Að öllu jöfnu ætti aðeins að gefa prófunarefnasambandið einu sinni. Nota má meðferðaráætlun með endurteknum skömmtum ef eiturefnafræðilegar upplýsingar gefa tilefni til þess. Venjulegar íkomuleiðir eru með pípusetningu um munn eða innsprautun í kviðarhol. Aðrar íkomuleiðir geta einnig hentað.

Tilraunadýr

Mælt er með rottum eða músum sem prófunartegundum. Heilbrigð, fullkynþroska dýr eru valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa.

Fjöldi og kyn

Nota skal hæfilegan fjölda meðhöndlaðra karldýra, að teknu tilliti til sjálfsprottins breytileika í þeim líffræðilegu einkennum sem verið er að meta. Velja skal fjöldann út frá fyrirframákvarðaðri næmni greiningarinnar og marktektarstigi. Til dæmis skulu vera nógu mörg karldýr í hverjum skammtahópi í dæmigerðri prófun til að 30–50 kvendýr verði með fangi á hverju pörunartímabili.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Venjulega skal í hverri tilraun vera samskeiða, jákvæður samanburður og neikvæður (burðarefni) samanburður. Ef fyrir liggja viðunandi niðurstöður úr jákvæðum samanburði úr tilraunum sem hafa nýlega verið gerðar á sömu rannsóknarstofu má nota þær í stað samskeiða, jákvæðs samanburðar. Jákvæð samanburðarefni skal nota í hæfilega litlum skömmtum (t.d. MMS (metýlmetansúlfónat), í kviðarhol, 10 mg/kg) til að sýna fram á næmi prófunarinnar.

Skammtastærðir

Venjulega skal nota þrjár skammtastærðir. Stærsti skammturinn ætti að framkalla merki um eiturhrif eða minnkaða frjósemi hjá meðferðardýrunum. Í ákveðnum tilvikum getur ein háskammtastærð verið fullnægjandi.

Markprófun

Óeitruð efnasambönd skal prófa með 5 g/kg í einni gjöf eða með 1 g/kg/dag við endurtekna gjöf.

Verkferli

Nokkrar meðferðaráætlanir eru tiltækar. Algengast er að prófunarefnið sé gefið einu sinni. Nota má aðrar meðferðaráætlanir.

Karldýrin eru pöruð raðbundið hvert fyrir sig með einu eða tveimur ómeðhöndluðum, óspjölluðum kvendýrum með hæfilegum millibilum eftir meðferð. Kvendýrin eru höfð hjá karldýrunum á tímabili sem svarar til lengdar minnst eins gangferils eða þar til mökun hefur átt sér stað, sem sjá má af sæði í leggöngum eða tilvist leggangatappa.

Fjöldi parana eftir meðferð stjórnast af meðferðaráætluninni og ætti að tryggja að öll kímfrumustigin náist eftir meðferð.

Kvendýrin eru aflífuð á seinni helmingi meðgöngu og leginnihald skoðað til að ákvarða fjölda dauðra og lifandi fanga. Með skoðun á eggjastokkum má ákvarða fjölda gulbúa.

2. **GÖGN**

Gögn skal setja fram í töfluformi til að sýna fjölda karldýra, fjölda kvendýra með fangi og fjölda kvendýra sem eru ekki með fangi. Niðurstöður úr hverri pörun eru skráðar sérstaklega ásamt auðkennum hvers karldýrs og kvendýrs. Fyrir hvert kvendýr skal skrá pörunarviku, skammtastærðina sem karldýrið fær og tíðni lifandi og dauðra fanga.

Útreikningur á samanlögðum, ríkjandi banvænum áhrifum byggist á samanburði á fjölda lifandi fanga á hvert kvendýr í prófunarhópnum og fjölda lifandi fanga á hvert kvendýr í samanburðarhópnum. Gerð er greining á hlutfallinu milli dauðra og lifandi fanga í meðferðarhópnum, miðað við sama hlutfall í samanburðarhópnum, til að sýna fanglát eftir hreiðrun.

Ef gögn eru skráð sem snemmkomin og síðkomin dauðsföll, skulu töflurnar sýna það skýrt. Ef fanglát fyrir hreiðrun eru metin skal það skráð. Hægt er að reikna út fanglát fyrir hreiðrun sem muninn á fjölda gulbúa og fjölda hreiðraðra fanga eða sem fækkun á meðalfjölda hreiðraðra fanga á hvert leg í samanburði við samanburðarparanir.

Meta skal gögnin með viðeigandi tölfræðiaðferðum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— tegund, stofn, aldur og þyngd dýranna, sem eru notuð, og fjöldi dýra af hvoru kyni í tilrauna- og viðmiðunarhópum,

— prófunarefni, burðarefni, skammtastærðir, sem eru prófaðar, og rök fyrir vali á skammtastærðum, neikvæður og jákvæður samanburður og gögn um eiturhrif,

— íkomuleið og meðferðaráætlun,

— pörunaráætlun,

— hvaða aðferð er notuð til að ákvarða að pörun hafi átt sér stað,

— hvenær dýr er aflífað,

— viðmiðanir fyrir mat á ríkjandi, banvænum áhrifum,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef við á,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.23. PRÓFUN Á LITNINGABREYTINGUM Í SÁÐSTOFNFRUMUM SPENDÝRA

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 483 um prófanir: prófun á litningabreytingum í sáðstofnfrumum spendýra (1997).

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með prófun í lífi á litningabreytingum í sáðstofnfrumum er að sanngreina hvort efni valdi byggingarlegum litningabreytingum í sáðstofnfrumum spendýra (1., 2., 3., 4. og 5. heimild). Byggingarlegar breytingar geta verið tvenns konar, annars vegar litningsbreytingar og hins vegar litningsþráðarbreytingar. Þorri efnafræðilegra stökkbreytivalda kallar fram litningsþráðarbreytingar en litningabreytingar sjást líka. Þessi aðferð er ekki ætluð fyrir mælingu á breytingum á fjölda og er að jafnaði ekki notuð í þeim tilgangi. Stökkbreytingar í litningum og tengdir atburðir eru orsök margra erfðasjúkdóma í mönnum.

Með þessari prófun er unnt að greina litningabreytingar í sáðstofnfrumum og því er þess vænst að hún geti nýst til að spá fyrir um framköllun arfgengra stökkbreytinga í kímfrumum.

Nagdýr eru venjulega notuð til þessarar prófunar. Þessi frumuerfðafræðilega prófun í lífi er notuð til að greina litningabreytingar í jafnskiptingu sáðstofnfrumna. Þessi aðferð er ekki notuð fyrir aðrar markfrumur.

Til að greina litningsþráðarbreytingar í sáðstofnfrumum skal skoða frumur í fyrstu jafnskiptingunni eftir lok meðhöndlunar áður en þessar skemmdir hverfa í næstu frumuskiptingum á eftir. Unnt er að afla frekari upplýsinga um meðhöndlaðar sáðstofnfrumur með litningagreiningu, þar sem litningabreytinga er leitað, í stigum frá 5. stigi fyrri forfasa til miðfasa I í rýriskiptingu (e. *diakinesis-metaphase I*) þegar meðhöndluðu frumurnar verða að sáðfrumum.

Með þessari prófun í lífi er ætlunin að kanna hvort stökkbreytivaldar líkamsfrumna séu einnig virkir í kímfrumum. Að auki gagnast prófun á sáðstofnfrumum við að meta hættu á stökkbreytingum þar eð hún gefur kost á að taka til skoðunar þætti efnaskipta í lífi sem og lyfjahvörf og viðgerðarferli DNA.

Í eistunum er fjöldi kynslóða sáðstofnfrumna og þær eru misnæmar fyrir meðhöndlun með íðefnum. Litningabreytingarnar, sem koma fram, sýna því samloðunarsvörun meðhöndlaðra sáðstofnfrumuþýða þar sem sérhæfðar sáðstofnfrumur, sem eru þarna í mestum mæli, eru ráðandi. Vegna eðlis- og lífeðlisfræðilegs tálma þekjustoðfrumnanna og blóð-/eistnatálmans veltur það á staðsetningu mismunandi kynslóða sáðstofnfrumna í eistunum að hve miklu leyti þær eru í snertingu við almennu blóðrásina.

Þessi prófun hentar ekki ef rök eru fyrir því að prófunarefnið, eða hvarfgjarnt umbrotsefni þess, nái ekki út í markvefinn.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Litningsþráðarbreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að stakir litningsþræðir rofna eða þeir rofna og tengjast síðan aftur öðrum þráðum.

Litningabreyting: skemmd á byggingu litnings sem lýsir sér í því að báðir litningsþræðirnir rofna á sama stað eða þeir rofna báðir á sama stað og tengjast síðan aftur.

Skarð: litlaus skemmd sem er mjórri en sem nemur breidd eins litningsþráðar og þar sem uppröðun litningsþráðanna er nálægt því að vera eðlileg.

Breyting á fjölda: breyting á fjölda litninga frá því sem eðlilegt er hjá þeim dýrum sem eru notuð.

Fjöllitnun: margfeldi á fjölda einlitna litninga (n), að tvílitnun undanskilinni (þ.e. 3n, 4n o.s.frv.).

Byggingarleg breyting: breyting á byggingu litnings sem kemur fram við smásjárskoðun á miðfasa frumuskiptingar sem úrfellingar, breytingar innan litninga eða breytingar milli litninga.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu eftir viðeigandi váhrifaleið og eru síðan aflífuð þegar meðferðin hefur staðið hæfilega lengi. Áður en dýrin eru aflífuð eru þau meðhöndluð með miðfasa-stöðvandi efni (t.d. Colcemid® eða kolsisíni). Litningasýni eru því næst útbúin úr kímfrumum og lituð og frumur í miðfasa síðan skoðaðar í leit að litningabreytingum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Algengt er að nota karldýr kínahamstra og músa. Þá má einnig nota karldýr af öðrum heppilegum tegundum spendýra. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngdinni.

1.4.1.2. *Aðbúnaður og fóðrun*

Almennu skilyrðin, sem eru tilgreind í almenna inngangínum að B-hluta, gilda en þó ætti að leitast við að halda rakanum við 50–60%.

1.4.1.3. *Undirbúningur dýra*

Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum karldýrum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt. Dýrin skulu látin laga sig að umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í minnst fimm daga áður en rannsóknin hefst.

1.4.1.4. *Tilreiðsla skammta*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru gefin dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunarefni óblönduð eða þynnt. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunarefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni.

1.4.2.2. *Samanburður*

Í hverri prófun skal vera samskeiða, jákvæður og neikvæður (leysir eða burðarefni) samanburður. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu.

Efni, sem eru notuð við jákvæðan samanburð, ættu að framkalla byggingarlegar litningabreytingar í lífi hjá sáðstofnfrumum þegar þau eru gefin í váhrifastyrkleika sem vænst er að valdi greinanlegri aukningu umfram það sem gerist við bakgrunnsgildi.

Velja skal skammtastærðir fyrir jákvæðan samanburð sem framkalla skýr áhrif en þó þannig að sá sem les af geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnisglerin. Það er ásættanlegt að íkomuleið fyrir jákvæða samanburðinn sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunarefnið og að sýni séu tekin aðeins í eitt skipti. Auk þess má kanna hvort nota megi íðefni við jákvæðan samanburð sem eru úr sama flokki og prófunarefnið, ef þau eru tiltæk. Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
sýklófosfamíð sýklófosfamíðmónóhýdrat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
sýklóhexýlamín	108-91-8	203-629-0
mítómýsín C	50-07-7	200-008-6
einliðuakrýlamíð	79-06-1	201-173-7
tríetýlenmelamín	51-18-3	200-083-5

Í hvert skipti sem sýni eru tekin skal hafa með neikvæðan samanburðarhóp sem er meðhöndlaður einvörðungu með leysi eða burðarefni en að öðru leyti meðhöndlaður á sama hátt og meðferðarhóparnir nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg samanburðargögn sem staðfesta að viðunandi breytileiki sé milli dýra og að hlutfall frumna með litningabreytingar sé viðunandi. Auk þess skal vera samanburður án meðhöndlunar nema fyrir liggi rannsóknarsöguleg eða birt samanburðargögn sem sýna fram á að leysirinn eða burðarefnið, sem valið hefur verið, framkalli hvorki skaðleg né stökkbreytandi áhrif.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Fjöldi dýra**

Í hverjum meðferðarhópi og hverjum samanburðarhópi skulu vera a.m.k. fimm greiningarbær karldýr.

1.5.2. **Meðferðaráætlun**

Æskilegt er að gefa prófunarefnin einu sinni eða tvisvar (þ.e. í einni meðferð eða tveimur). Prófunarefni má þó einnig gefa í tveimur áföngum, þ.e. meðferðin skiptist í tvær gjafir á sama degi og skulu ekki líða nema fáeinar klukkustundir á milli en þannig er auðveldara að gefa mikið rúmmál efnis. Ef skömmtun er með öðrum hætti skal færa vísindaleg rök fyrir því.

Hjá þeim hópi, sem fær stærsta skammtinn, eru sýni tekin tvisvar sinnum eftir meðferð. Þar eð prófunarefnið getur haft áhrif á hraða frumuhringsins eru sýni tekin einu sinni snemma og einu sinni seint, u.þ.b. 24 og 48 klukkustundum eftir lok meðferðar. Þegar um er að ræða aðra skammta en stærsta skammt skal taka sýni 24 klukkustundum eða hálfum öðrum frumuhring eftir meðferð nema vitað sé að annar tími henti betur til að greina áhrifin (6. heimild).

Auk þess má taka sýni á öðrum tímum. Ef um er að ræða íðefni, sem geta kallað fram litningaeftirlegu eða haft áhrif sem eru óháð S-fasa, getur verið heppilegt að taka sýni fyrr (1. heimild).

Meta skal í hverju tilviki um sig hvort það er heppilegt að nota meðferðaráætlun þar sem meðferðin er endurtekin Í kjölfar endurtekinnar meðferðar skal aflífa dýrin 24 klukkustundum (hálfum öðrum frumuhring) eftir síðustu meðferð. Auk þess má taka sýni á öðrum tímum eftir því sem við á.

Áður en dýrin eru aflífuð er hæfilegum skammti af miðfasastöðvandi efni (t.d. kolsisíni eða Colcemid®) sprautað í kviðarhol þeirra. Eftir það eru sýni tekin úr dýrunum með hæfilegu millibili. Fyrir mýs er þetta millibil u.þ.b. 3–5 klukkustundir en fyrir kínahamstra er millibilið u.þ.b. 4–5 klukkustundir.

1.5.3. **Skammtastærðir**

Ef engin nothæf gögn liggja fyrir og framkvæma þarf skammtastærðarrannsókn skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund og stofni tilraunadýrs og sama skömmtunarfyrirkomulagi og í meginrannsókninni (7. heimild). Ef um eiturhrif er að ræða skal nota þrjár skammtastærðir áður en sýni eru tekin í fyrsta sinn. Þessum skammtastærðum skal hagað þannig að eiturhrifin verði allt frá því að vera í hámarki og niður í það að vera lítil eða engin. Þegar sýni eru tekin síðar nægir að nota eingöngu stærsta skammtinn. Stærsti skammturinn er skilgreindur sem sá skammtur sem kallar fram þannig merki um eiturhrif að búast megi við því, miðað við óbreytta skömmtunaráætlun, að stærri skammtar valdi dauða.

Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða efni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmtum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og jafnskiptingarræsar) og þau skulu metin hvert um sig. Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í sáðstofnfrumum (t.d. þau að hlutfallið milli jafnskiptinga sáðstofnfrumna og fyrsta og annars miðfasa í rýriskiptingu minnkar en minnkunin má ekki fara yfir 50%).

1.5.4. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar á dag og er gefin í einum áfanga eða í tveimur áföngum á sama degi og ef erfðaeiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta í markprófuninni.

1.5.5. **Gjöf skammta**

Dýrunum er yfirleitt gefið prófunarefnið í maga með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu eða efninu er sprautað í kviðarhol. Gefa má efnið eftir öðrum leiðum en þá skal það stutt rökum. Það ræðst af stærð tilraunadýrsins hve mikinn vökva hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun. Rúmmálið skal ekki vera meira en 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Færa skal rök fyrir því ef rúmmálið er meira en þetta. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

1.5.6. **Undirbúningur litninga**

Frumusvifblöndur eru fengnar úr öðru eða báðum eistum strax eftir aflífun dýranna, settar í undirþrýsta lausn og festar. Frumunum er síðan strokið á sýnisgler og þær litaðar.

1.5.7. **Greining**

Úr hverju dýri skal greina a.m.k. 100 frumur í vel dreifðum miðfasa (þ.e. minnst 500 frumur í miðfasa fyrir hvern hóp). Fjöldinn má vera minni ef margar breytingar greinast. Öll sýnisgler, þ.m.t. jákvæð og neikvæð samanburðarsýni, skulu kóðuð hvert um sig áður en kemur að smásjárgreiningu. Þar eð festingarferlið leiðir oft til þess að hluti frumnanna í miðfasa rofnar og þær tapa við það litningum skal þess gætt að fjöldi þráðhafta í þeim frumum, sem eru metnar, sé $2n \pm 2$.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gögn fyrir hvert einstakt dýr skulu sett fram í töfluformi. Tilraunaeiningin er eitt dýr. Fyrir hvert dýr skal ákvarða fjölda frumna með byggingarlegum litningsbreytingum og fjölda litningabreytinga fyrir hverja frumu. Skrá skal mismunandi tegundir byggingarlegra litningsbreytinga og tilgreina fjölda þeirra og tíðni í meðferðar- og samanburðarhópunum. Skörð skulu skráð sérstaklega og gera skal grein fyrir þeim en þau skulu að jafnaði ekki tekin með í reikningum á heildartíðni breytinga.

Ef bæði jafnskipting (e. *mitosis*) og rýriskipting (e. *meiosis*) sjást í sýnunum skal ákvarða hlutfallið milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar sem mælikvarða á frumueiturhrif hjá öllum meðferðardýrum og dýrum í neikvæða samanburðinum í heildarsýni með 100 frumum í skiptingu fyrir hvert dýr. Ef aðeins sést jafnskipting í sýnunum skal ákvarða jafnskiptingarhlutfallið í a.m.k. 1000 frumum fyrir hvert dýr.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Nokkrar viðmiðanir eru notaðar til að ákvarða jákvæða niðurstöðu, t.d. skammtatengd aukning á hlutfallslegum fjölda frumna með litningabreytingum eða ótvíræð aukning á fjölda frumna með breytingum í sýnum sem kemur fram við eina sýnatöku hjá hópi sem fær stakan skammt. Fyrst skal huga að líffræðilegu mikilvægi niðurstaðnanna. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum (8. heimild). Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð. Óvissar niðurstöður skulu gerðar skýrari með frekari prófunum, helst með breyttum tilraunaskilyrðum.

Ef niðurstöður fyrir tiltekið prófunarefni standast ekki framangreindar viðmiðanir telst efnið ekki stökkbreytandi í þessari prófun.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður úr prófun í lífi á litningabreytingum í sáðstofnfrumum benda til þess að prófunarefnið kalli fram byggingarlega litningabreytingar í kímfrumum þeirrar dýrategundar sem er notuð í prófuninni. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram litningabreytingar í kímfrumum þeirrar dýrategundar sem er notuð í prófuninni.

Fjalla skal um líkindi þess að prófunarefnið eða umbrotsefni þess nái út í markvefinn.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi og aldur dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik líkamsþyngdar fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— gögn úr skammtastærðarrannsókn, hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— rökstuðningur fyrir vali á íkomuleið,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— rökstuðningur fyrir vali á aflífunartímum,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— ítarleg lýsing á áætlunum um meðferð og sýnatöku,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— auðkenni miðfasastöðvandi efnis, styrkur þess og hversu lengi meðferð stendur,

— aðferðir við undirbúning sýnisglerja,

— viðmiðanir fyrir mat á breytingum í litningum,

— fjöldi frumna sem eru skoðaðar úr hverju dýri,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— merki um eiturhrif,

— jafnskiptingarhlutfall,

— hlutfall milli jafnskiptinga í sáðstofnfrumum og miðfasa fyrstu og annarrar rýriskiptingar,

— tegund og fjöldi breytinga, tilgreint sérstaklega fyrir hvert dýr,

— heildarfjöldi breytinga í hverjum hópi,

— fjöldi frumna með breytingum í hverjum hópi,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef unnt er,

— tölfræðilegar greiningar, ef um þær er að ræða,

— gögn um samskeiða, neikvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfrávikum,

— gögn um samskeiða, jákvæðan samanburð,

— breytingar á litnun, komi þær fram.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Adler, I.D., (1986) Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, bls. 477-484.

2) Adler, I.D., (1984) Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, bls. 275-306.

3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964) An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, bls. 289-294.

4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L., (1990) In Vivo Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 115-141.

5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y., (1978) A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, bls. 207-209.

6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N., (1994) International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, bls. 313-318.

7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. and Richold, M., (1992) Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, bls. 313-319.

8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K., (1989) Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 184-232.

B.24. **BLETTAPRÓFUN Á MÚSUM**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Þetta er prófun í lífi á músum þar sem fósturvísar, sem eru að þroskast, eru látnir verða fyrir váhrifum frá íðefnum. Markfrumurnar í fósturvísunum, sem eru að þroskast, eru sortukímfrumur og markgenin eru þau sem ráða lit á feldhárum. Fósturvísarnir, sem eru að þroskast, eru arfblendnir fyrir fjölda þessara feldlitagena. Stökkbreyting í ríkjandi genasamsætu eða tap á ríkjandi genasamsætu (vegna ýmissa atburða í erfðaefninu) slíks gens í sortukímfrumu leiðir til tjáningar á víkjandi svipgerð í afkvæmisfrumum hennar sem kemur fram sem blettur með breyttum lit í feldi viðkomandi músar. Fjöldi afkvæma með þessa bletti, þ.e.a.s. stökkbrigðin, eru talin og tíðni þeirra borin saman við tíðnina hjá afkvæmum þar sem fósturvísarnir voru aðeins meðhöndlaðir með leysinum. Með blettaprófun á músum má greina það sem talið er vera líkamsfrumustökkbreytingar í fósturfrumum.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Ef hægt er skal leysa prófunarefnin upp eða útbúa úr þeim svifblöndu í jafnþrýstinni saltlausn. Íðefni, sem eru ekki vatnsleysanleg, eru leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í heppilegum burðarefnum. Burðarefnið, sem er notað, má hvorki trufla verkun prófunarefnisins né valda eiturhrifum. Nota skal ferska blöndu af prófunarefninu.

Tilraunadýr

Mýs af T-stofni („nonagouti“, a/a; „chinchilla““, „pink eye“, cchp/cchp; „brown“, b/b; „dilute“, „short ear“, d-se/d-se; „piebald spotting“, s/s) eru annaðhvort paraðar með músum af HT-stofni („pallid“, „nonagouti“, „brachypody“, pa-a-bp/pa-a-bp; „leaden fuzzy“, ln-fz/ln-fz; „pearl pe/pe“) eða með C57BL („nonagouti“, a/a). Nota má aðra viðeigandi kynblöndun, t.d. milli Nmri-stofns („nonagouti“, a/a; „albino“, c/c) og DBA-stofns („nonagouti“, a/a; „brown“, b/b; „dilute“ d/d), að því tilskildu að afkvæmin verði „nonagouti“.

Fjöldi og kyn

Nota skal nægilega mörg kvendýr með fangi til að fá fram hæfilegan fjölda lifandi afkvæma fyrir hverja skammtastærð sem er notuð. Stærð úrtaksins fer eftir fjölda bletta, sem sjást hjá meðferðarmúsunum, og stærðargráðu samanburðargagnanna. Aðeins er hægt að viðurkenna neikvæða niðurstöðu ef a.m.k. 300 afkvæmi kvendýranna, sem fengu meðferð með stærsta skammtinum, hafa verið talin.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Samskeiða, samanburðargögn frá músum, sem aðeins hafa verið meðhöndlaðar með burðarefninu (neikvæður samanburður), skulu vera tiltæk. Rannsóknarsöguleg gögn frá sömu rannsóknarstofu má taka með til að auka næmi prófunarinnar, að því tilskildu að þau séu einsleit. Gögn úr jákvæðum samanburði, sem hafa fengist nýlega á sömu rannsóknarstofu úr meðferð með íðefni sem vitað er að sýnir stökkbreytandi hrif í þessari prófun, þurfa að liggja fyrir ef ekki greinast nein stökkbreytandi hrif af prófunaríðefninu.

Íkomuleið

Venjulegar íkomuleiðir eru með pípusetningu um munn eða innsprautun í kviðarhol kvendýra með fangi. Meðferð við innöndun eða aðrar íkomuleiðir eru notaðar þegar við á.

Skammtastærðir

Notaðar eru minnst tvær skammtastærðir þar sem önnur kallar fram merki um eiturhrif eða fækkun unga í goti. Óeitruð efni eru prófuð í eins stórum skömmtum og unnt er.

Verkferli

Venjulega er gefinn stakur skammtur á 8., 9. eða 10. degi meðgöngu en 1. dagurinn er dagurinn þegar leggangatappinn sést fyrst. Þessir dagar samsvara 7,25, 8,25 og 9,25 dögum eftir getnað. Endurtaka má skömmtun þessa daga.

Greining

Afkvæmin eru kóðuð og metin með tilliti til bletta milli þriðju og fjórðu viku eftir got. Greint er á milli þrenns konar bletta:

a) hvítra bletta, innan 5 mm frá miðlínu kviðar, sem eru taldir stafa af frumudrápi (WMVS);

b) gulra, „agouti“-líkra bletta á spenasvæði, kynfærum, hálsi, holhandar- og nárasvæði, sem og miðju enninu, sem gert er ráð fyrir að stafi af misþroskun (MDS), og

c) litaðra og hvítra bletta sem dreifast tilviljunarkennt um feldinn og eru taldir stafa af stökkbreytingum í líkamsfrumum (RS).

Allar tegundirnar þrjár eru metnar en aðeins sú síðastnefnda, stökkbreytingar í líkamsfrumum (RS), hefur erfðafræðilega þýðingu. Vandamálið við að greina á milli misþroskunar (MDS) og stökkbreytinga í líkamsfrumum (RS) má leysa með flúrljómssmásjárrannsókn á hársýnum.

Skrá skal athugasemdir um augljósan, stórsæjan, formfræðilegan afbrigðileika afkvæmanna.

2. **GÖGN**

Gögnin eru sett fram sem heildarfjöldi metinna afkvæma og fjöldi þeirra sem hefur einn eða fleiri bletti sem taldir eru stafa af stökkbreytingum í líkamsfrumum. Meðferðargögn og neikvæð samanburðargögn eru borin saman með viðeigandi aðferðum. Gögn eru einnig sett fram fyrir hvern gothóp.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— hvaða stofnar eru notaðir við kynblöndunina,

— fjöldi kvendýra með fangi í tilrauna- og samanburðarhópunum,

— meðalgotstærð í tilrauna- og samanburðarhópunum við got og fráfærur,

— skammtastærð eða -stærðir prófunarefnisins,

— hvaða leysir er notaður,

— á hvaða degi meðgöngu meðferðin fór fram,

— íkomuleið við meðferð,

— heildarfjöldi metinna afkvæma og fjöldi unga með bletti vegna frumudauða (WMVS), vegna misþroskunar (MDS) og vegna stökkbreytinga í líkamsfrumum (RS) í tilrauna- og samanburðarhópunum,

— stórsær, formfræðilegur afbrigðileiki,

— tengsl skammts og svörunar fyrir stökkbreytingar í líkamsfrumum (RS), ef unnt er,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.25. **ARFGENG LITNINGAYFIRFÆRSLA Í MÚSUM**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREINING

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófun á arfgengri litningayfirfærslu í músum greinir byggingarlegar og tölulegar breytingar í kímfrumum spendýra eins og þær koma fram í afkvæmum fyrstu kynslóðar. Litningabreytingarnar sem greinast eru gagnkvæmar litningayfirfærslur og, ef kvenkynsafkvæmi eru tekin með, tap á X-litningi. Berar yfirfærslna og XO-kvendýr sýna skerta frjósemi sem er notað við val á F_1-afkvæmum til frumuerfðafræðilegra greininga. Ákveðnar tegundir yfirfærslna (X-sjálflitningur og c-t-gerð) geta orsakað algera ófrjósemi. Litningayfirfærslur eru frumuerfðafræðilega greindar í frumum í stigum frá 5. stigi fyrri forfasa til miðfasa I í rýriskiptingu hjá karldýrum, annaðhvort F_1-karldýrum eða karlkynsafkvæmum F_1-kvendýra. XO-kvendýrin þekkjast frumuerfðafræðilega af því að fjöldi litninga í jafnskiptingu í beinmerg er aðeins 39.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Undirbúningur

Prófunarefnin eru leyst upp í jafnþrýstinni saltlausn. Ef þau leysast ekki upp í saltlausn eru þau leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi burðarefnum. Nota skal ferskar lausnir af prófunarefna-sambandinu. Ef burðarefni er notað til að auðvelda skömmtun má það ekki hafa truflandi áhrif á prófunarefnasambandið eða kalla fram eiturhrif.

Íkomuleið

Íkomuleiðir eru venjulega pípusetning um munn eða innsprautun í kviðarhol. Aðrar íkomuleiðir geta einnig hentað.

Tilraunadýr

Til að auðvelda ræktun og frumufræðilega sannprófun eru þessar tilraunir gerðar með músum. Ekki er þörf á neinum sérstökum stofni músa. Hins vegar skal meðalgotstærð stofnsins vera yfir átta og tiltölulega stöðug.

Notuð eru heilbrigð, kynþroska dýr.

Fjöldi dýra

Sá fjöldi dýra sem þörf er fyrir er háður tíðni sjálfsprottinna yfirfærslna og því lágmarksvakningarhlutfalli sem þarf til að fá jákvæða niðurstöðu.

Venjulega er prófunin gerð með greiningum á karlkyns F_1-afkvæmum. Prófa skal a.m.k. 500 karlkyns F_1-afkvæmi í hverjum skammtahópi. Ef kvenkyns F_1-afkvæmi eru einnig notuð þarf 300 karldýr og 300 kvendýr.

Notkun neikvæðs og jákvæðs samanburðar

Nægileg gögn til samanburðar, sem fengin eru úr samskeiða samanburði og rannsóknarsögulegum samanburði, skulu liggja fyrir. Ef fyrir liggja viðunandi niðurstöður úr jákvæðum samanburði úr tilraunum sem hafa nýlega verið gerðar á sömu rannsóknarstofu má nota þær í stað samskeiða, jákvæðs samanburðar.

Skammtastærðir

Prófuð er ein skammtastærð, venjulega stærsti skammtur sem veldur lágmarkseiturhrifum en hefur ekki áhrif á æxlunaratferli eða lifun. Til að staðfesta tengsl milli skammts og svörunar þarf tvo aðra og minni skammta til viðbótar. Óeitruð efni eru prófuð í eins stórum skömmtum og unnt er.

Verkferli

Meðferð og pörun

Tvær mismunandi meðferðaráætlanir koma til greina. Oftast er notuð áætlun þar sem prófunarefnið er gefið einu sinni. Einnig má gefa prófunarefnið sjö daga í viku í 35 daga. Fjöldi parana eftir meðferð stjórnast af meðferðaráætluninni og ætti að tryggja að öll kímfrumustigin náist. Í lok pörunartímabilsins eru kvendýrin sett hvert í sitt í búr. Þegar kvendýrin gjóta eru dagsetning, gotstærð og kyn afkvæmanna skráð. Öll karlkynsafkvæmi eru færð frá og öll kvenkynsafkvæmi fjarlægð nema þau séu notuð í tilrauninni.

Prófun á arfblendni eftir litningagyfirfærslu

Notuð er önnur af tveimur mögulegum aðferðum:

— prófun á frjósemi F_1-afkvæma og síðan sannprófun á mögulegum yfirfærsluberum með frumuerfðafræðilegri greiningu,

— frumuerfðafræðileg greining á öllum karlkyns F_1-afkvæmum án undangengins vals með prófun á frjósemi.

a) Prófun á frjósemi

Sýna má fram á skerta frjósemi einstaklings af F_1-kynslóð með athugun á gotstærð og/eða greiningu á leginnihaldi kvendýra sem hann var paraður við.

Fyrst eru ákvarðaðar viðmiðanir fyrir bæði eðlilegri og skertri frjósemi hjá músastofninum sem er notaður.

Athugun á gotstærð: F_1-karldýrin, sem á að prófa, eru sett hvert í sitt búr með kvendýrum, annaðhvort úr sömu tilraun eða úr hópnum (e. *colony*). Búrin eru skoðuð daglega frá og með 18. degi eftir pörun. Gotstærð og kyn F_2-afkvæma eru skráð við got og ungarnir síðan fjarlægðir. Ef kvenkyns F_1-afkvæmi eru prófuð eru F_2-afkvæmum úr litlum gotum haldið eftir fyrir frekari prófun. Kvenkyns yfirfærsluberar eru staðfestir með frumuerfðafræðilegri greiningu á litningagyfirfærslu í einhverju karlkyns afkvæma þeirra. XO-kvendýr þekkjast á breytingu á kynjahlutfalli afkvæma þeirra úr 1:1 í 1:2 karldýr á móti kvendýrum. Þegar notuð er raðbundin aðferð er eðlilegum F_1-dýrum sleppt við frekari prófun ef fyrsta F_2-gotið nær, eða er yfir, þeirri stærð sem ákveðin var fyrir fram að væri eðlileg, annars eru annað eða þriðja F_2-gotið skoðað.

F_1-dýr, sem ekki er hægt að flokka sem eðlileg eftir skoðun á allt að þremur F_2-gotum, eru annað hvort rannsökuð frekar með greiningu á innihaldi legs kvendýra eftir mökun eða sett beint í frumuerfðafræðilega greiningu.

Greining á innihaldi legs: minnkuð gotstærð yfirfærslubera stafar af fósturvísisláti svo að mikill fjöldi dauðra fanga bendir til litningagyfirfærslu í dýrinu sem verið er að prófa. F_1-karldýr, sem á að prófa, eru hvert um sig pöruð með tveimur til þremur kvendýrum. Getnaður er staðfestur með daglegri leit að leggangatöppum að morgni. Kvendýrin eru aflífuð 14–16 dögum síðar og lifandi og dauð föng í legi þeirra skráð.

b) Frumuerfðafræðileg greining

Eistnasýni eru undirbúin með loftþurrkunartækni. Yfirfærsluberar þekkjast á fleirgildum litningum í stigum frá 5. stigi fyrri forfasa til miðfasa I í rýriskiptingu hjá fyrsta stigs sáðfrumuvísum. Ef a.m.k. tvær frumur með fleirgilda litninga sjást er litið svo á að prófunardýrið sé yfirfærsluberi.

Ef val vegna æxlunar hefur ekki átt sér stað eru öll F_1-karldýr rannsökuð á frumuerfðafræðilegan hátt. Minnst 25 frumur, í stigum frá 5. stigi fyrri forfasa til miðfasa I í rýriskiptingu, hjá hverju karldýri eru metnar með smásjárskoðun. Rannsaka þarf miðfasa jafnskiptingar í sáðstofnfrumum og beinmerg hjá F_1-karldýrum með lítil eistu og brenglaða rýriskiptingu, sem stöðvast áður en kemur að 5. stigi fyrri forfasa rýriskiptingar (e. *diakinesis*), eða hjá F_1-kvendýrum, sem talin eru vera XO-berar. Þegar óvenjulega langir og/eða stuttir litningar eru í 10 frumum er það vísbending um sérstaka litningayfirfærslu (c-t gerð) sem gerir karldýrin ófrjó. Sumar yfirfærslur X-sjálflitninga, sem gera karldýr ófrjó, er aðeins hægt að greina með bandagreiningu á litningum í jafnskiptingu. Ef 39 litningar eru í 10 jafnskiptingum er talið sannað að um XO-kvendýr sé að ræða.

2. **GÖGN**

Gögn eru sett fram í töfluformi.

Meðalgotstærð og kynjahlutfall hjá afkvæmum foreldrakynslóðarinnar við got og fráfærur eru tilgreind fyrir hvert pörunartímabil.

Að því er varðar mat á frjósemi F_1-dýra er meðalgotstærð eftir allar eðlilegar paranir og gotstærð hjá hverjum einstökum F_1-yfirfærslubera tilgreind. Að því er varðar greiningu á leginnihaldi er tilgreindur meðalfjöldi lifandi og dauðra fanga eftir eðlilega pörun og fjöldi lifandi og dauðra fanga fyrir hverja pörun F_1-yfirfærslubera.

Að því er varðar frumuerfðafræðilega greiningu í stigum frá 5. stigi fyrri forfasa til miðfasa I í rýriskiptingu eru fjöldi og tegundir fleirgildra samsetninga og heildarfjöldi frumna tilgreind fyrir hvern yfirfærslubera.

Fyrir ófrjóa F_1-einstaklinga er heildarfjöldi parana og lengd pörunartímabils tilgreind. Tilgreina skal þyngd eistna og gefa ítarlegar upplýsingar um frumuerfðafræðilega greiningu.

Fyrir XO-kvendýr er meðalgotstærð, kynjahlutfall hjá F_1-afkvæmum og frumuerfðafræðilegar greiningarniðurstöður tilgreind.

Ef hugsanlegir F_1-yfirfærsluberar eru forvaldir með frjósemisprófunum skulu töflurnar innihalda upplýsingar um hversu mörg þessara útvöldu dýra reyndust síðar vera arfblendin eftir yfirfærslu.

Greina skal frá gögnum úr neikvæðum samanburði og jákvæðum samanburðartilraunum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— músastofn, aldur dýranna og þyngd meðferðardýranna,

— fjöldi dýra af foreldrakynslóð (e. *parental animal*) af hvoru kyni í tilrauna- og samanburðarhópum,

— prófunarskilyrði, ítarleg lýsing á meðferð, skammtastærðum, leysum og pörunaráætlun,

— fjöldi og kyn afkvæma hvers kvendýrs, fjöldi og kyn afkvæma sem eru alin til greiningar á litningayfirfærslu,

— tími og viðmiðanir fyrir greiningu á litningayfirfærslu,

— fjöldi yfirfærslubera og ítarleg lýsing á þeim, þ.m.t. æxlunargögn og gögn um leginnihald, ef við á,

— frumuerfðafræðileg verkferli og ítarlegar upplýsingar um smásjárgreiningar, helst með myndum,

— tölfræðilegt mat,

— umfjöllun um niðurstöður,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.26. PRÓFUN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM MUNN — 90 DAGA RANNSÓKN Á EITURHRIFUM HJÁ NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA UM MUNN

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á hálflangvinnum eiturhrifum um munn er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 408 um prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Við mat á eitureiginleikum íðefnis má ákvarða hálflangvinn eiturhrif um munn við inngjöf endurtekinna skammta eftir að fyrstu upplýsinga um eiturhrif hefur verið aflað úr prófunum á bráðum eiturhrifum eða 28 daga prófunum á eiturhrifum við endurtekna skammta. Í 90 daga rannsókninni fást upplýsingar um hugsanlegar heilbrigðishættur vegna endurtekinna váhrifa sem ná yfir langan tíma, þ.e. vaxtarskeiðið frá því eftir fráfærur og þar til fullorðinsaldri er náð. Rannsóknin veitir upplýsingar um helstu eiturhrif, um marklíffæri og hvort um uppsöfnun er að ræða og hún getur gert kleift að meta þau váhrif sem valda engum merkjanlegum, skaðlegum áhrifum en það má nota til að velja skammtastærðir fyrir langtíma-rannsóknir og fastsetja viðmiðanir um öryggi með tilliti til váhrifa á menn.

Í aðferðinni er lögð sérstök áhersla á taugafræðilega endapunkta og hún veitir vísbendingar um ónæmisfræðileg áhrif og um áhrif á æxlun. Enn fremur er lögð áhersla á þörfina fyrir vandlegar, klíniskar athuganir á dýrunum til að afla eins mikilla upplýsinga og unnt er. Þessi rannsókn ætti að gera kleift að sanngreina íðefni sem geta haft taugaeiturhrif eða áhrif á ónæmiskerfið eða æxlunarfærin sem kann að gefa tilefni til frekari rannsókna.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd (g, mg) eða sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg) eða sem fastur styrkur í fóðri (milljónarhlutar).

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrum hópum tilraunadýra er gefið prófunarefnið daglega um munn í stigskiptum skömmtum, ein skammtastærð fyrir hvern hóp, í 90 daga. Dýrin eru skoðuð vandlega á inngjafartímabilinu til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. Dýrin undirbúin

Nota skal heilbrigð dýr sem hafa verið látin venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. 5 daga og hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna. Dýrunum skal slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hverju dýri skal úthlutað einkvæmu auðkennisnúmeri.

1.4.2. Tilreiðsla skammta

Dýrunum er gefið prófunarefnið með magaslöngu eða í fóðri eða drykkjarvatni. Aðferðin við gjöf um munn ræðst af því hver tilgangurinn með rannsókninni er og eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins.

Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/yrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins við þau skilyrði sem ríkja þegar það er gefið.

1.4.3. **Prófunarskilyrði**

1.4.3.1. *Tilraunadýr*

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin þótt einnig megi nota aðrar tegundir nagdýra, t.d. mýs. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Skammtagjöf ætti að hefjast eins fljótt og unnt er eftir fráfærur og í öllum tilvikum áður en þau ná níu vikna aldri. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig. Ef rannsóknin er undanfari langtímarannsóknar á langvinnum eiturhrifum skal nota dýr af sama stofni og uppruna í báðum rannsóknunum.

1.4.3.2. *Fjöldi og kyn*

Nota skal minnst 20 dýr (10 kvendýr og 10 karldýr) fyrir hverja skammtastærð. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Á grundvelli fyrri vitneskju um íðefnið eða skylt, hliðstætt efni skal yfirvega að bæta tíu dýra fylgihópi (fimm af hvoru kyni) við samanburðarhópinn og hópinn sem fær stærsta skammtinn og fylgjast með þeim, að loknu meðferðartímabilinu, til að kanna hvort einhver eiturhrif ganga til baka eða verða viðvarandi. Lengd þessa tímabils að lokinni meðferð skal miðuð við þau áhrif sem vart verður.

1.4.3.3. *Skammtastærðir*

Nota ætti a.m.k. þrjá misstóra skammta og samskeiða samanburð nema um markprófun sé að ræða (sjá lið 1.4.3.4). Skammtastærðir geta byggst á niðurstöðum úr rannsóknum með endurteknum skömmtum eða skammtastærðarrannsóknum og skal þar tekið tillit til hvers kyns eiturefnafræðilegra gagna og gagna um eiturefnahvörf sem liggja fyrir að því er varðar prófunarefnið eða skyld efni. Við val á stærsta skammtinum skal það haft að leiðarljósi, svo fremi að eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins setji því ekki skorður, að kalla fram eiturhrif en hvorki dauða né miklar þjáningar. Velja skal röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 6–10).

Samanburðarhópurinn skal vera hópur sem fær ekki meðferð eða samanburðarhópur sem fær eingöngu burðarefni ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður. Ef prófunarefni er gefið með fóðrinu og það veldur því að dregur úr fóðuráti getur verið gagnlegt að fóðra samanburðarhóp samhliða til að greina hvort minna fóðurát stafi af því að prófunarefnið hefur áhrif á bragðgæði fóðursins eða hvort það stafi af eiturhrifum.

Hafa skal í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins og annarra aukefna, eftir því sem við á: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins, sem geta breytt eitureiginleikum þess, og áhrif á fóðurát eða vatnsdrykkju eða næringarástand dýranna.

1.4.3.4. *Markprófun*

Ef engin merkjanleg, skaðleg áhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.5. VERKLAGSREGLUR

1.5.1. **Gjöf skammta**

Dýrunum er gefið prófunarefnið sjö daga í viku í 90 daga. Færa skal rök fyrir því ef önnur tilhögun er á gjöf skammta, t.d. ef gefið er fimm daga í viku. Ef prófunarefnið er gefið í maga skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar

nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vökvajafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) í fóðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna en taka skal fram hvor kosturinn er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann eftir þörfum þannig að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Ef 90 daga rannsókn er undanfari langtímarannsóknar á eiturhrifum skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

1.5.2. **Athuganir**

Athugunartímabilið skal vera a.m.k. 90 dagar. Dýrum í fylgihópi, sem ætlaður er til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í hæfilegan tíma til að kanna hvort eiturhrifin eru varanleg eða ganga til baka.

Gera skal almennar, klínískar athuganir a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Klínískt ástand dýranna skal skráð. Öll dýr eru skoðuð, að jafnaði kvölds og morgna og a.m.k. tvisvar á dag alla daga, með tilliti til sjúkdómsástands og dauða.

Gera skal ítarlegar, klínískar athuganir á öllum dýrunum, a.m.k. í eitt skipti á undan fyrstu váhrifum (til að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri) og a.m.k. vikulega eftir það. Þessar athuganir skulu gerðar utan við búr dýranna, helst í stöðluðu rými og alltaf á sömu tímum. Þær skulu vandlega skráðar og helst skal styðjast við stigakerfi sem prófunarstofan hefur skilgreint á skýran hátt. Reynt skal eftir megni að sjá til þess að skilyrði við athuganirnar breytist sem minnst. Merki sem fylgst er með skulu vera, en ekki takmarkast við, breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslosun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og vöðvakippi og vöðvaspennu, staðnað atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hringi) eða afbrigðilegt atferli (t.d. sjálfssköddun eða ef dýrin ganga aftur á bak) (1. heimild).

Framkvæma skal augnskoðun með augnspegli eða öðru jafngildu tæki við hæfi áður en prófunarefnið er gefið og við lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin en a.m.k. dýrin í hópnum sem fær stærsta skammtinn og dýrin í samanburðarhópunum. Ef breytingar greinast í augum skulu öll dýrin skoðuð.

Undir lok váhrifatímabilsins, en aldrei fyrr en í 11. viku, skal meta skynviðbrögð við áreiti af ýmsu tagi (1. heimild) (t.d. hljóð- eða sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri) (2.–4. heimild) og einnig skal meta gripstyrk (5. heimild) og hreyfistarfsemi (6. heimild). Nánari lýsingu á verkferlunum, sem fylgja má, er að finna í þeim heimildum sem vísað er til. Hins vegar má einnig notast við annars konar verkferli en vísað er til.

Sleppa má athugunum á starfrænum þáttum sem gera á undir lok rannsóknarinnar ef gögn um athuganir á starfrænum þáttum liggja fyrir úr öðrum rannsóknum og daglegar, klínískar athuganir hafa ekki leitt ekki í ljós neina starfræna skerðingu.

Í undantekningartilvikum má einnig sleppa athugunum á starfrænum þáttum þegar um er að ræða hópa sem sýna svo greinileg merki um eiturhrif að það myndi hafa veruleg áhrif á niðurstöður úr starfrænum prófunum.

1.5.2.1. *Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja*

Öll dýr skulu vigtuð a.m.k. vikulega. Mæla skal fóðurát og vatnsdrykkju a.m.k. vikulega. Ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju vikulega. Vatnsdrykkja skal einnig metin í rannsóknum þar sem prófunarefnið er gefið með fóðri eða með magaslöngu og breyting getur orðið á vatnsdrykkju.

1.5.2.2. *Blóðfræði og klínísk lífefnafræði*

Blóðsýni skulu tekin og geymd, ef við á, við viðeigandi skilyrði og tilgreina skal þá stað þar sem sýnin eru tekin. Undir lok prófunartímabilsins eru sýni tekin rétt áður en dýrin eru aflífuð eða í tengslum við aflífunarferlið.

Í lok prófunartímabilsins og þegar sýni eru tekin í framvindu prófunarinnar skulu fara fram blóðrannsóknir varðandi eftirfarandi þætti: blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna, blóðflögufjölda og mælingu á storknunartíma og storknunarhæfni blóðs.

Gera skal klíniskar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum, sem tekin eru úr öllum dýrum rétt áður en eða um leið og dýrin eru aflífuð (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð í rannsókninni), til að rannsaka helstu eiturhrif í vefjum, einkum áhrif á nýru og lifur. Taka má sýni í framvindu rannsóknarinnar, eins og í blóðfræðilegum rannsóknum, til klíniskra, lífefnafræðilegra prófana. Mælt er með því að dýrin séu látin fasta nóttina áður en blóðsýnin eru tekin ([1]). Greiningar á blóðvökva eða sermi skulu ná yfir natríum, kalíum, glúkósa, heildarkólesteról, þvagefni, köfnunarefni úr þvagefni í blóði, kreatínín, heildarprótín og albúmín og fleiri en tvö ensím sem geta bent til áhrifa á lifrarfrumur (t.d. alanínamínótransferasa, aspartatamínótransferasa, basískan fosfatasa, gammaglútamýltranspeptíðasa og sorbítólvetnissvipti). Bæta má við mælingum á fleiri ensímum (úr lifur eða öðrum líffærum) og gallsýrum sem geta undir tilteknum kringumstæðum gefið gagnlegar upplýsingar.

Valfrjálst er hvort eftirfarandi greiningar eru gerðar á þvagsýnum, sem tekin eru með tímasettri söfnun þvags, í síðustu viku rannsóknarinnar til ákvörðunar á: útliti, rúmmáli, osmólalstyrk eða eðlisþyngd, sýrustigi, prótíni, glúkósa og blóði/blóðkornum.

Að auki kemur til álita að rannsaka sermimerki sem benda til almennra vefjaskemmda. Aðrar mælingar, sem ætti að gera ef þekktir eiginleikar prófunarefnisins geta haft, eða grunur leikur á að þeir hafi, áhrif á tilsvarandi efnaskiptamynstur, eru mælingar á kalsíumi, fosfór, þríglýseríði eftir föstu, tilteknum hormónum, methemóglóbíni og kólínesterasa. Mæla þarf þessa þætti þegar um er að ræða efni í tilteknum flokkum eða eftir því sem við á í hverju einstöku tilviki.

Almennt þarf nálgunin að vera sveigjanleg eftir dýrategundum og þeim áhrifum tiltekins efnis sem koma fram og/eða búist er við.

Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega hvort mæla skuli blóðfræðilegar og klíniskar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst en að jafnaði er ekki farið fram á að þessara gagna sé aflað á undan meðferð (7. heimild).

1.5.2.3. *Stórsæ krufning*

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrum í rannsókninni og skal m.a. rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá lifur, nýrum, nýrnahettum, eistum, eistalyppum, legi, eggjastokkum, hóstarkirtli, milta, heila og hjarta allra dýranna (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð í rannsókninni), eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna.

Eftirfarandi vefir skulu varðveittir í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefjar og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili (helstu svæði, þ.m.t. stórheili, litli heili og mænukylfa/heilabrú), mæna (þrír hæðarfletir: háls-, brjóst- og lendarhluti), heiladingull, skjaldkirtill, kalkkirtill, hóstarkirtill, vélinda, munnvatnskirtlar, magi, smáþarmar og digurgirni (þ.m.t. safneitlingar í dausgörn (e. *Peyer´s patches*)), lifur, bris, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, barki og lungu (varðveitt með fyllingu af festiefni og síðan ídýfingu), ósæð, kynkirtlar, leg, aukalíffæri kynkerfis, mjólkurkirtlar kvendýra, blöðruhálskirtill, þvagblaðra, gallblaðra (í músum), eitlar (helst einn eitill nálægt íkomuleiðinni og annar langt frá henni til að greina altæk áhrif), úttaug (set- eða sköflungstaug), helst í námunda við viðkomandi vöðva, og sneið af beinmergi (og/eða nýlegt beinmergssýni), húð og augu (hafi breytingar greinst við augnskoðun). Niðurstöður, bæði klíniskar og aðrar, geta bent til þess að rannsaka þurfi fleiri vefi. Einnig skal varðveita öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri út frá þekktum eiginleikum prófunarefnisins.

1.5.2.4. *Vefjameinafræði*

Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum úr öllum dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Þessar rannsóknir skulu einnig ná til dýra úr öllum öðrum skammtahópum ef meðferðartengdar breytingar koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

([1]) Við allmargar mælingar á sermi og blóðvökva, einkum þegar glúkósi er mældur, er best að láta dýrin fasta yfir nótt. Aðalástæðan er sú að óhjákvæmilega verða niðurstöður breytilegri ef dýrin eru ekki látin fasta og það getur falið þau áhrif sem eru lítt áberandi og gert túlkun erfiðari. Á hinn bóginn gæti fasta yfir nótt haft áhrif á almenn efnaskipti dýranna og það getur truflað dagleg váhrif frá prófunarefninu, einkum í rannsóknum þar sem efnið er gefið með fóðri. Ef dýrin eru látin fasta yfir nótt skulu klíniskar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar eftir að athuganir á starfrænum þáttum í 4. viku rannsóknarinnar hafa farið fram

Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í meðferðarhópunum.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

2.1. GÖGN

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, tegund vefjaskemmda og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda.

Þegar við á skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðilegu aðferðirnar og gögnin, sem á að greina, á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand, hreinleiki og eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— auðkennisgögn,

— burðarefni (ef við á): rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

2.2.2. **Prófunartegund:**

— tegund og stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

2.2.3. **Prófunarskilyrði:**

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður, styrkinn sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— raunskammtastærðir (mg/kg líkamsþyngdar á dag) og stuðull til að umreikna styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð, ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

2.2.4. **Niðurstöður:**

— líkamsþyngd og breytingar á líkamsþyngd,

— fóðurát og vatnsdrykkja, ef við á,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þ.m.t. merki um eiturhrif;

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— niðurstöður úr augnskoðun,

— mat á skynfæravirkni, gripstyrk og hreyfistarfsemi (liggi fyrir upplýsingar um þau atriði),

— blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,

— líkamsþyngd við aflífun og þyngd líffæra og þyngdarhlutföll milli líffæra og líkama,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

3. **HEIMILDIR**

1) IPCS (1986) Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

2) Tupper, D.E., Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, bls. 999-1003.

3) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, bls. 691-704.

4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, bls. 267-283.

5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T., (1979) A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, bls. 233-236.

6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C., (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, bls. 599-609.

7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al., (1996) "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", Fundam. & Appl. Toxicol., 29, bls. 198-201.

B.27. PRÓFUN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM MUNN — 90 DAGA RANNSÓKN Á EITURHRIFUM HJÁ ÖÐRUM DÝRUM EN NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA UM MUNN

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á hálflangvinnum eiturhrifum um munn er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 409 um prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Við mat á eitureiginleikum íðefnis má ákvarða hálflangvinn eiturhrif um munn við inngjöf endurtekinna skammta eftir að fyrstu upplýsinga um eiturhrif hefur verið aflað úr prófunum á bráðum eiturhrifum eða 28 daga prófunum á eiturhrifum við endurtekna skammta. Í 90 daga rannsókninni fást upplýsingar um hugsanlegar heilbrigðishættur vegna endurtekinna váhrifa á skeiði þegar vöxtur er hraður og fram til fyrsta hluta fullorðinsskeiðs. Rannsóknin veitir upplýsingar um helstu eiturhrif, um marklíffæri og hvort um uppsöfnun er að ræða og hún getur gert kleift að meta þau váhrif sem valda engum merkjanlegum, skaðlegum áhrifum en það má nota til að velja skammtastærðir fyrir langtímarannsóknir og fastsetja viðmiðanir um öryggi með tilliti til váhrifa á menn.

Prófunaraðferðin gerir kleift að greina skaðleg áhrif vegna váhrifa íðefnis hjá dýrategundum, sem eru ekki nagdýr, og hún skal aðeins notuð:

— ef áhrif, sem fram hafa komið í öðrum rannsóknum, benda til þess að þörf sé á nánari upplýsingum/lýsingu á eiginleikum í annarri tegund, sem er ekki nagdýr, eða

— ef rannsóknir á eiturefnahvörfum benda til þess að tiltekin tegund, sem er ekki nagdýr, sé heppilegasta tilraunadýrið eða

— ef önnur sértæk rök réttlæta að notuð sé dýrategund sem er ekki nagdýr.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd (g, mg) eða sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg) eða sem fastur styrkur í fóðri (milljónarhlutar).

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrum hópum tilraunadýra er gefið prófunarefnið daglega um munn í stigskiptum skömmtum, ein skammtastærð fyrir hvern hóp, í 90 daga. Dýrin eru skoðuð vandlega á inngjafartímabilinu til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. Val á dýrategund

Ef tilraunadýrið er ekki nagdýr er venjulega notaður hundur sem á að vera af skilgreindu kyni; oft verður bíkill (e. *beagle*) fyrir valinu. Einnig er heimilt að nota önnur dýr, t.d. svín eða dvergsvín. Ekki er mælt með því að prímatar séu notaðir en ef það er gert skal færa rök fyrir því. Nota skal ung, heilbrigð dýr og ef um hunda er að ræða skal helst hefja skammtagjöf við 4–6 mánaða aldur og eigi síðar en þegar þeir eru níu mánaða gamlir. Ef rannsóknin er undanfari langtímarannsóknar á langvinnum eiturhrifum skal nota dýr af sömu tegund/kyni í báðum rannsóknunum.

1.4.2. **Dýrin undirbúin**

Nota skal heilbrigð, ung dýr sem hafa verið látin venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni og hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Lengd aðlögunartímans skal ráðast af þeirri dýrategund, sem valin er til prófunar, og af uppruna dýranna. Mælt er með a.m.k. fimm dögum, ef um er að ræða hunda eða svín sem eru sérstaklega ræktuð í ræktunarstöð á staðnum, og a.m.k. tveim vikum ef um er að ræða aðfengin dýr. Tilgreina skal tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna. Dýrunum skal slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hverju dýri skal úthlutað einkvæmu auðkennisnúmeri.

1.4.3. **Tilreiðsla skammta**

Prófunarefnið má gefa með fóðri eða drykkjarvatni, með magaslöngu eða í hylkjum. Aðferðin við gjöf um munn ræðst af því hver tilgangurinn með rannsókninni er og eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins.

Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/yrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins við þau skilyrði sem ríkja þegar það er gefið.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Nota skal minnst átta dýr (fjögur kvendýr og fjögur karldýr) fyrir hverja skammtastærð. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Fjöldi dýra í lok rannsóknarinnar þarf að vera nægilegur til að mat á eiturhrifum verði marktækt. Á grundvelli fyrri vitneskju um efnið eða skylt, hliðstætt efni skal yfirvega að bæta átta dýra fylgihópi (fjórum af hvoru kyni) við samanburðarhópinn og hópinn sem fær stærsta skammtinn og fylgjast með þeim, að loknu meðferðartímabilinu, til að kanna hvort einhver eiturhrif ganga til baka eða verða viðvarandi. Lengd þessa tímabils að lokinni meðferð skal miðuð við þau áhrif sem vart verður.

1.5.2. **Skömmtun**

Nota ætti a.m.k. þrjár skammtastærðir og samskeiða samanburð nema um markprófun sé að ræða (sjá lið 1.5.3). Skammtastærðir geta byggst á niðurstöðum úr rannsóknum með endurteknum skömmtum eða skammtastærðarannsóknum og skal þar tekið tillit til hvers kyns eiturefnafræðilegra gagna og gagna um eiturefnahvörf sem liggja fyrir að því er varðar prófunarefnasambandið eða skyld efni. Við val á stærsta skammtinum skal það haft að leiðarljósi, svo fremi að eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins setji því ekki skorður, að kalla fram eiturhrif en hvorki dauða né miklar þjáningar. Velja skal röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 6–10).

Samanburðarhópurinn skal vera hópur sem fær ekki meðferð eða samanburðarhópur sem fær eingöngu burðarefni ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður. Ef prófunarefni er gefið með fóðrinu og það veldur því að dregur úr fóðuráti getur verið gagnlegt að fóðra samanburðarhóp samhliða til að greina hvort minna fóðurát stafi af því að prófunarefnið hefur áhrif á bragðgæði fóðursins eða hvort það stafi af eiturhrifum.

Hafa skal í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins og annarra aukefna, eftir því sem við á: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins, sem geta breytt eitureiginleikum þess, og áhrif á fóðurát eða vatnsdrykkju eða næringarástand dýranna.

1.5.3. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg, skaðleg áhrif koma fram í prófun með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.5.4. **Gjöf skammta**

Dýrunum er gefið prófunarefnið sjö daga í viku í 90 daga. Færa skal rök fyrir því ef önnur tilhögun er á gjöf skammta, t.d. ef gefið er fimm daga í viku. Ef prófunarefnið er gefið í maga skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Að öllu jöfnu skal rúmmálið haft eins lítið og unnt er. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vökvajafnvægi. Ef prófunarefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) í fóðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna og skal tilgreina þann kost sem er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu eða í hylkjum skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann eftir þörfum þannig að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýranna. Ef 90 daga rannsókn er undanfari langtímarannsóknar á langvinnum eiturhrifum skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum.

1.5.5. **Athuganir**

Athugunartímabilið skal vera a.m.k. 90 dagar. Dýrum í fylgihópi, sem ætlaður er til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í hæfilegan tíma til að kanna hvort eiturhrifin eru varanleg eða ganga til baka.

Gera skal almennar, klínískar athuganir a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Klínískt ástand dýranna skal skráð. Öll dýr skulu skoðuð, að jafnaði kvölds og morgna og a.m.k. tvisvar á dag alla daga, með tilliti til sjúkdómsástands og dauða.

Gera skal ítarlegar, klínískar athuganir á öllum dýrunum, a.m.k. í eitt skipti á undan fyrstu váhrifum (til að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri) og a.m.k. vikulega eftir það. Þessar athuganir skulu gerðar, verði því við komið, utan við búr dýranna, í stöðluðu rými og helst alltaf á sömu tímum. Reynt skal eftir megni að sjá til þess að skilyrði við athuganirnar breytist sem minnst. Skrá skal öll merki um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara. Athuganirnar skulu m.a. ná yfir breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslosun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárrisi, stærð augasteins og óvenjulegu öndunarmynstri). Einnig skal skrá breytingar á göngulagi, líkamsstöðu og viðbrögð við meðhöndlun, svo og vöðvakippi og vöðvaspennu, staðnað atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu eða ganga stöðugt í hring) eða hvers kyns annað afbrigðilegt atferli.

Framkvæma skal augnskoðun með augnspegli eða öðru jafngildu tæki við hæfi áður en prófunarefnið er gefið og við lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin en a.m.k. dýrin í hópnum sem fær stærsta skammtinn og dýrin í samanburðarhópunum. Ef meðferðartengdar breytingar greinast í augum dýra skulu öll dýrin skoðuð.

1.5.5.1. *Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja*

Öll dýr skulu vigtuð a.m.k. vikulega. Mæla skal fóðurát og vatnsdrykkju a.m.k. vikulega. Ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni skal einnig mæla vatnsdrykkju vikulega. Vatnsdrykkja skal einnig metin í rannsóknum þar sem prófunarefnið er gefið með fóðri eða með magaslöngu og breyting getur orðið á vatnsdrykkju.

1.5.5.2. *Blóðfræði og klínísk lífefnafræði*

Blóðsýni skulu tekin og geymd, ef við á, við viðeigandi skilyrði og tilgreina skal þá staði þar sem sýnin eru tekin. Undir lok prófunartímabilsins eru sýni tekin rétt áður en dýrin eru aflífuð eða í tengslum við aflífunarferlið.

Í upphafi rannsóknarinnar, síðan annaðhvort á mánaðarfresti eða að hálfnaðri prófuninni og loks í lok prófunartímabilsins skulu fara fram blóðfræðilegar rannsóknir, þ.m.t. varðandi eftirfarandi þætti: blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna, blóðflögufjölda og mælingu á storknunarhæfni, s.s. storknunartíma, próþrombíntíma eða þrombóplastíntíma.

Gera skal klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóðsýnum, sem tekin eru úr öllum dýrum í upphafi prófunarinnar, síðan annaðhvort á mánaðarfresti eða að hálfnaðri prófuninni og loks í lok prófunartímabilsins, til að rannsaka helstu eiturhrif í vefjum og einkum áhrif á nýru og lifur. Þættir, sem rétt er að kanna, eru jafnvægi rafkleyfra efna, kolvetnaefnaskipti og starfsemi lifrar og nýrna. Val á sértækum greiningum ræðst af athugunum á verkunarhætti prófunarefnisins. Dýr skulu látin fasta í hæfilegan tíma,

sem ræðst af tegundinni, áður en blóðsýni eru tekin. Mælt er með því að eftirtaldir þættir verði m.a. greindir: kalsíum, fosfór, klóríð, natríum, kalíum, glúkósi eftir föstu, alanínamínótransferasi, aspartata-mínótransferasi, ornitíndekarboxýlasi, gammaglútamýltranspeptíðasi, köfnunarefni í þvagefni, albúmín, kreatínín í blóði, heildargallrauði og heildarprótín í sermi.

Greiningar á þvagsýnum, sem tekin eru með tímasettri söfnun þvags, skulu gerðar a.m.k. í upphafi rannsóknarinnar, í henni miðri og loks í lok hennar. Eftirfarandi þætti skal m.a. greina í þvagsýnum: útlit, rúmmál, osmólalstyrk eða eðlisþyngd, sýrustig, prótín, glúkósa og blóð/blóðkorn. Bæta má við fleiri mæliþáttum, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau áhrif sem fram koma.

Að auki kemur til álita að rannsaka merki um almennar vefjaskemmdir. Aðrar mælingar, sem geta verið nauðsynlegar fyrir fullnægjandi eiturefnafræðilegt mat, eru m.a. mælingar á lípíðum, hormónum, sýru- og basajafnvægi, methemóglóbíni og kólínesterasahömlun. Gera má fleiri klíniskar, lífefnafræðilegar mælingar, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau áhrif sem koma fram. Mæla þarf þessa þætti þegar um er að ræða efni í tilteknum flokkum eða eftir því sem við á í hverju einstöku tilviki.

Almennt þarf nálgunin að vera sveigjanleg eftir dýrategundum og þeim áhrifum tiltekins efnis sem koma fram og/eða búist er við.

1.5.5.3. *Stórsæ krufning*

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrum í rannsókninni og skal m.a. rannsaka vandlega yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Skera skal alla aðliggjandi vefi frá lifur, gallblöðru, nýrum, nýrnahettum, eistum, eistalyppum, eggjastokkum, legi, skjaldkirtli (ásamt kalkkirtlum) hóstarkirtli, milta, heila og hjarta allra dýranna (að undanskildum þeim sem finnast dauðvona og/eða eru aflífuð í rannsókninni), eftir því sem við á, og þessi líffæri skulu vigtuð blaut eins fljótt og hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna.

Eftirfarandi vefir skulu varðveittir í þeim festingarmiðli sem er heppilegastur, bæði fyrir viðkomandi tegund vefjar og fyrirhugaðar, vefjameinafræðilegar rannsóknir: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili (helstu svæði, þ.m.t. stórheili, litli heili og mænukylfa/heilabrú), mæna (þrír hæðarfletir: háls-, brjóst- og lendarhluti), heiladingull, augu, skjaldkirtill, kalkkirtill, hóstarkirtill, vélinda, munnvatnskirtlar, magi, smáþarmar og digurgirni (þ.m.t. safneitlingar í dausgörn (*Peyer´s patches*)), lifur, gallblaðra, bris, nýru, nýrnahettur, milta, hjarta, barki og lungu, ósæð, kynkirtlar, leg, aukalíffæri kynkerfis, mjólkurkirtlar kvendýra, blöðruhálskirtill, þvagblaðra, eitlar (helst einn eitill nálægt íkomuleiðinni og annar langt frá henni til að greina altæk áhrif), úttaug (set- eða sköflungstaug), helst í námunda við viðkomandi vöðva, og sneið af beinmerg (og/eða nýlegt beinmergssýni) og húð. Niðurstöður, bæði klíniskar og aðrar, geta bent til þess að rannsaka þurfi fleiri vefi. Einnig skal varðveita öll líffæri sem líkur eru á að séu marklíffæri út frá þekktum eiginleikum prófunarefnisins.

1.5.5.4. *Vefjameinafræði*

Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum, a.m.k. úr öllum dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Þessi rannsókn skal einnig ná til dýra úr öllum öðrum skammtahópum ef meðferðartengdar breytingar koma fram í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í meðferðarhópunum.

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

2.1. GÖGN

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, tegund vefjaskemmda og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda.

Þegar við á skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðilegu aðferðirnar og gögnin, sem á að greina, á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand, hreinleiki og eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— auðkennisgögn,

— burðarefni (ef við á): rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

2.2.2. **Prófunartegund:**

— tegund og stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

2.2.3. **Prófunarskilyrði:**

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður, styrkinn sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— raunskammtastærðir (mg/kg líkamsþyngdar á dag) og stuðull til að umreikna styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð, ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

2.2.4. **Niðurstöður:**

— líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd,

— fóðurát og vatnsdrykkja, ef við á,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þ.m.t. merki um eiturhrif;

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau eru geta gengið til baka eða ekki),

— augnskoðun,

— blóðprófanir með viðkomandi viðmiðunargildum,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,

— líkamsþyngd við aflífun og þyngd líffæra og þyngdarhlutföll milli líffæra og líkama,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

B.28. RANNSÓKN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM UM HÚÐ — 90 DAGA RANNSÓKN Á NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA Á HÚÐ

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er borið daglega í stigskiptum skömmtum á húð nokkurra hópa tilraunadýra, ein skammtastærð fyrir hvern hóp, í 90 daga. Dýrin eru athuguð daglega þann tíma sem borið er á þau til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa. Skömmu fyrir prófunina er feldurinn klipptur af hrygg tilraunadýranna. Einnig má raka hann af en það skal gera u.þ.b. 24 klukkustundum fyrir prófunina. Venjulega þarf að endurtaka klippingu eða rakstur u.þ.b. vikulega. Þegar feldur er klipptur eða rakaður af skal þess gætt að skaða ekki húðina. Fjarlæga skal feld af a.m.k. 10% af yfirborði skrokksins til að bera prófunarefnið á. Taka skal tillit til þyngdar dýrsins þegar ákveðið er hvaða svæði skal klippt eða rakað og hversu stórt það á að vera. Þegar prófuð eru föst efni, sem má dyfta ef við á, skal væta prófunarefnið nægilega með vatni, eða hentugu burðarefni sé þess þörf, til að tryggja góða snertingu við húðina. Fljótandi prófunarefni eru yfirleitt notuð óþynnt. Borið er á daglega fimm til sjö daga í viku.

1.6.2. *Prófunarskilyrði*

1.6.2.1. Tilraunadýr

Nota má fullvaxnar rottur, kanínur eða naggrísi. Nota má aðrar tegundir en færa þarf rök fyrir notkun þeirra. Við upphaf prófunarinnar ætti breytileiki í þyngd ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalþyngdinni. Ef rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum um húð er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sömu tegund og stofni í báðum rannsóknunum.

1.6.2.2. Fjöldi og kyn

Nota skal minnst 20 dýr (10 kvendýr og 10 karldýr) með heilbrigða húð fyrir hverja skammtastærð. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Að auki má meðhöndla 20 dýra fylgihóp (10 dýr af hvoru kyni) með stærsta skammti í 90 daga og fylgjast með því í 28 daga eftir meðferð hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg eða síðkomin.

1.6.2.3. Skammtastærðir

Ef burðarefni er notað þarf minnst þrjár skammtastærðir ásamt samanburðarhópi eða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni. Váhrifatímabilið skal vera minnst sex klukkustundir á dag. Prófunarefnið skal borið á um svipað leyti á hverjum degi og magn efnisins, sem borið er á, skal aðlagað með reglulegu millibili (vikulega eða aðra hverja viku) til þess að skammtastærðin haldist sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað til að auðvelda skammtagjöf skal það gefið samanburðarhópnum, sem fær eingöngu burðarefni, á sama hátt og meðferðarhópunum og í sama magni og hópnum sem fær stærsta skammtinn. Stærsti skammturinn ætti að valda eiturhrifum en engum eða fáum dauðsföllum. Minnsti skammturinn ætti ekki að framkalla nein merki um eiturhrif. Ef til er nothæft mat á styrk váhrifa á menn skal minnsti styrkurinn vera yfir því gildi. Æskilegt er að milliskammtastærðin framkalli minnstu merkjanlegu eiturhrifin. Ef milliskammtar eru fleiri en einn skal þeim dreift þannig að þeir framkalli stigskipt eiturhrif. Í hópum, sem fá litla eða meðalstóra skammta, og í samanburðarhópunum þarf dánarhlutfallið að vera lágt til að marktækt mat fáist á niðurstöðunum.

Ef áburður prófunarefnisins veldur ákafri húðertingu skal minnka styrkleikana en það getur leitt til þess að dragi úr öðrum eiturhrifum eða þau hverfi í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Ef húðin hefur skaddast mjög getur verið nauðsynlegt að stöðva rannsóknina og hefja nýja rannsókn með minni styrkleikum.

1.6.3. Markprófun

Ef engin eiturhrif koma fram í forrannsókn með skammtastærð, sem er 1000 mg/kg, eða með stærri skammti sem er ákveðinn samkvæmt vitneskju um váhrifin sem menn geta orðið fyrir kunna frekari prófanir að teljast ónauðsynlegar.

1.6.4. Athugunartímabil

Athuga skal tilraunadýrin daglega með tilliti til merkja um eiturhrif. Skrá skal dauðastund og hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa.

1.6.5. Verkferli

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Dýrin eru meðhöndluð með prófunarefninu, helst sjö daga í viku, í 90 daga.

Dýrum í fylgihópum, sem ætlaðir eru til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í 28 daga í viðbót til að kanna hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg. Váhrifatíminn skal vera sex klukkustundir á dag.

Prófunarefnið skal borið jafnt á svæði sem er u.þ.b. 10% af heildaryfirborði líkamans. Þegar um er að ræða mjög eitruð efni má svæðið, sem borið er á, vera minna en þekja skal eins mikið af svæðinu og unnt er með sem þynnstu og jöfnustu lagi.

Meðan á váhrifum stendur er prófunarefninu haldið í snertingu við húðina með gisinni grisju og plástri sem veldur engri ertingu. Að auki skal búið svo um prófunarsvæðið að grisjan og prófunarefnið haldist á sínum stað og dýrin geti ekki innbyrt prófunarefnið. Hefta má dýrin til að koma í veg fyrir að þau innbyrði prófunarefnið en ekki er mælt með því að þeim sé haldið alveg hreyfingarlausum.

Í lok váhrifatímabilsins skal fjarlægja leifar af prófunarefninu, eftir því sem unnt er, með vatni eða hreinsa húðina á annan viðeigandi hátt.

Athuga skal öll dýrin daglega og skrá merki um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara. Athuganir á dýrunum í búrunum skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins, miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Mæla skal fóðurát dýranna vikulega og vigta þau vikulega. Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í rannsókninni til að tryggja að þeim fækki sem minnst vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Í lok rannsóknartímabilsins eru öll eftirlifandi dýr aflífuð og krufin í meðferðarhópunum sem ekki eru fylgihópar. Dauðvona dýr skal fjarlægja og aflífa og kryfja þegar eftir þeim er tekið.

Eftirfarandi rannsóknir eru venjulega gerðar á öllum dýrunum, að samanburðardýrunum meðtöldum:

a) Augnskoðun með augnspegli eða öðru jafngildu tæki við hæfi skal framkvæma áður en kemur að váhrifum frá prófunarefninu og við lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin en a.m.k. dýrin í hópnum sem fær stærsta skammtinn og dýrin í samanburðarhópunum. Ef breytingar greinast í augum skulu öll dýrin skoðuð.

b) Blóðfræðilegar rannsóknir skal gera í lok prófunartímabilsins, þ.m.t. varðandi blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna og mælingu á storknunarhæfni, s.s. storknunartíma, próþrombíntíma, þrombóplastíntíma eða blóðflögufjölda.

c) Klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóði skal gera í lok prófunartímabilsins. Jafnvægi rafkleyfra efna, kolvetnaefnaskipti og starfsemi lifrar og nýrna eru meðal þeirra þátta sem rétt þykir að kanna í öllum rannsóknunum. Val á sértækum greiningum ræðst af athugunum á verkunarhætti prófunarefnisins. Mælt er með því að eftirtaldir þættir verði greindir: kalsíum, fosfór, klóríð, natríum, kalíum, glúkósi eftir föstu (með viðeigandi föstutíma fyrir viðkomandi tegund), glútamínpýruvín-transamínasi í sermi ([1]), glútamínoxalóasetattransamínasi í sermi ([2]), ornitíndekarboxýlasi, gammaglútamýltranspeptíðasi, köfnunarefni í þvagefni, albúmín, kreatínín í blóði, heildargallrauði og heildarprótín í sermi. Aðrar mælingar, sem geta verið nauðsynlegar fyrir fullnægjandi eiturefnafræðilegt mat, eru m.a. mælingar á lípíðum, hormónum, sýru- og basajafnvægi, methemóglóbíni og kólínesterasavirkni. Gera má fleiri klínískar, lífefnafræðilegar mælingar, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau áhrif sem koma fram.

d) Að jafnaði er ekki þörf á þvagrannsóknum nema fram komi vísbending sem er grundvölluð á eiturhrifum sem búist er við eða koma fram.

Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega að mæla blóðfræðilega og klíníska, lífefnafræðilega þætti áður en skammtagjöf hefst.

Stórsæ krufning

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrunum og skal m.a rannsaka yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Lifur, nýru, nýrnahettur og eistu skal vigta vot eins fljótt hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna. Eftirfarandi líffæri og vefir skulu varðveitt í hentugum miðli til að gera megi frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir síðar: allar stórsæjar vefjaskemmdir, heili, þ.m.t. sneiðar af mænukylfu/heilabrú, hnykilbörkur og heilabörkur, heiladingull, skjaldkirtill/kalkkirtill, allur hóstarkirtilsvefur, (barki), lungu, hjarta, ósæð, munnvatnskirtlar, lifur, milta, nýru, nýrnahettur, bris, kynkirtlar, leg, aukalíffæri kynkerfis, gallblaðra (ef til staðar), vélinda, magi, skeifugörn, ásgörn, dausgörn, botnristill, ristill, endaþarmur, þvagblaðra, dæmigerður eitill, (mjólkurkirtill kvendýrs), (lærisvöðvakerfi), úttaug, (augu), (bringubein með beinmergi), (lærleggur — með liðyfirborði), (mæna í þremur hæðarflötum: háls-, brjóst- og lendarhluti) og (ytri tárakirtlar). Vefina, sem nefndir eru innan sviga, þarf aðeins að rannsaka ef merki eru um eiturhrif eða ef þeir eru í tengslum við marklíffæri.

Vefjameinafræðileg rannsókn

a) Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á eðlilegri og meðhöndlaðri húð og á líffærum og vefjum dýra í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn.

b) Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

c) Rannsaka skal marklíffæri í öðrum skammtahópum.

d) Ef rottur eru notaðar skal fara fram vefjameinafræðileg rannsókn á lungum dýra í hópunum, sem fá litla og meðalstóra skammta, til að leita að vísbendingum um sýkingu þar eð það er hentug aðferð til að meta heilsufar dýranna. Frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir er ekki nauðsynlegt að framkvæma reglubundið á dýrunum í þessum hópum en alltaf þarf að rannsaka þau líffæri sem sýna merki um skemmdir í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

e) Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í hinum meðferðarhópunum.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, tegund vefjaskemmda og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda. Meta skal niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

([1]) Núna þekktur sem alanínamínótransferasi í sermi.

([2]) Núna þekktur sem aspartatamínótransferasi í sermi.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður og fóður,

— prófunarskilyrði,

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað) og styrkleikar,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti,

— núlláhrifagildi, ef unnt er,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— upplýsingar um fóður og líkamsþyngd,

— niðurstöður augnskoðunar,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim (þ.m.t. úr þvagrannsóknum, ef þær eru gerðar),

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna ef unnt er,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.29. RANNSÓKN Á HÁLFLANGVINNUM EITURHRIFUM VIÐ INNÖNDUN — 90 DAGA RANNSÓKN Á NAGDÝRUM VIÐ ENDURTEKNA SKAMMTA VIÐ INNÖNDUN

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrir hópar tilraunadýra eru látnir verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í stigskiptum styrkleikum í tiltekinn tíma daglega í 90 daga og er notaður einn styrkleiki fyrir hvern hóp. Ef burðarefni er notað til að auðveldara verði að ná fram hæfilegum styrk prófunarefnisins í andrúmsloftinu er rétt að nota samanburðarhóp sem fær eingöngu burðarefni. Dýrin eru athuguð daglega á skömmtunartímabilinu til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart. Dýr, sem drepast á meðan á prófun stendur, eru krufin og í lok prófunar eru eftirlifandi dýr aflífuð og krufin.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. Undirbúningur

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir tilraunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa. Ef nauðsyn krefur má bæta hentugu burðarefni við prófunarefnið til að auðveldara verði að ná fram hæfilegum styrk prófunarefnisins í andrúmsloftinu. Ef burðarefni eða önnur íblöndunarefni eru notuð til að auðvelda skömmtun verður að vera fullvíst að þau valdi ekki eiturhrifum. Nota má rannsóknarsöguleg gögn ef við á.

1.6.2. Prófunarskilyrði

1.6.2.1. Tilraunadýr

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin nema vitað sé um frábendingar. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá viðeigandi meðalgildi. Ef rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við innöndun er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sömu tegund og stofni í báðum rannsóknunum.

1.6.2.2. Fjöldi og kyn

Nota skal minnst 20 dýr (10 kvendýr og 10 karldýr) fyrir hvern váhrifastyrkleika. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar. Auk þess má meðhöndla 20 dýra fylgihóp (10 dýr af hvoru kyni) með mesta styrk í 90 daga og fylgjast með því í 28 daga eftir meðferð hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg eða síðkomin.

1.6.2.3. Váhrifastyrkleikar

Ef burðarefni er notað þarf minnst þrjá styrkleika ásamt samanburðarhópi eða samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni (í styrk sem samsvarar styrk burðarefnisins í stærsta skammtinum). Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Mesti styrkurinn ætti að valda eiturhrifum en fáum eða engum dauðsföllum. Ef til er nothæft mat á styrk váhrifa á menn skal minnsti styrkurinn vera yfir því gildi. Æskilegt er að millistyrkurinn framkalli minnstu merkjanlegu eiturhrifin. Ef millistyrkleikar eru fleiri en einn skal þeim dreift þannig að þeir framkalli stigskipt eiturhrif. Í hópum, sem fá litla eða meðalstóra skammta, og í samanburðarhópunum þarf dánarhlutfallið að vera lágt til að marktækt mat fáist á niðurstöðunum.

1.6.2.4. Váhrifatími

Tímabil daglegra váhrifa ætti að vera sex klukkustundir eftir að styrkurinn í klefanum hefur náð jafnvægi. Nota má aðrar tímalengdir til að uppfylla sértækar kröfur.

1.6.2.5. Búnaður

Dýrin skal prófa með innöndunarbúnaði sem er hannaður til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Ef notaður er klefi skal hanna hann þannig að ekki verði of þröngt um dýrin og þau nái að anda að sér sem mestu af prófunarefninu. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli prófunarklefans. Láta má dýrið verða fyrir váhrifum um munn og nef, um höfuð eingöngu eða um allan líkamann með því að setja dýrið í einstaklingsklefa; fyrri aðferðirnar tvær halda upptöku prófunarefnisins eftir öðrum íkomuleiðum í lágmarki.

1.6.2.6. Athugunartímabil

Athuga skal tilraunadýrin daglega allan meðferðar- og afturbatatímann með tilliti til merkja um eiturhrif. Skrá skal dauðastund og hvenær merki um eiturhrif koma fram og hverfa.

1.6.3. Verkferli

Dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu daglega fimm til sjö daga í viku í 90 daga. Dýrum í fylgihópum, sem ætlaðir eru til eftirfylgniathugana, skal haldið án meðferðar í 28 daga í viðbót til að kanna hvort eiturhrifin ganga til baka eða eru varanleg. Hitastiginu við prófunina skal haldið við 22 ± 3 °C. Æskilegt er að rakastiginu sé haldið milli 30–70% en í sumum tilvikum (t.d. við prófanir á úðaefnum) getur það reynst óframkvæmanlegt. Ekki skal gefa fóður eða vatn meðan á váhrifum stendur.

Nota skal kvikt innöndunarkerfi með viðeigandi greiningar- og stjórnbúnaði fyrir styrkinn. Til að ákvarða hæfilega váhrifastyrkleika er mælt með tilraunaprófun. Stilla skal loftstreymið til að tryggja einsleitar aðstæður í öllum váhrifaklefanum. Kerfið á að tryggja að stöðugar váhrifaaðstæður náist svo fljótt sem auðið er.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

a) Hraði loftstreymis skal mældur (samfellt).

b) Raunstyrkur prófunarefnisins skal mældur á öndunarsvæðinu. Styrkurinn á daglega váhrifatímabilinu má ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu. Þegar um er að ræða ryk og úðaefni getur þó verið ómögulegt að hafa slíka stjórn á styrknum og eru þá leyfð stærri frávik. Halda skal styrkleikum eins stöðugum og unnt er frá degi til dags alla rannsóknina. Þegar verið er að þróa úðunarkerfið ber að greina agnastærð til að ákvarða stöðugleika úðastyrkleika. Framkvæma ber greiningar á agnastærð eins oft og nauðsynlegt er meðan á váhrifum stendur til að ákvarða hvort dreifing agnastærðar sé jöfn.

c) Hiti og raki.

d) Á váhrifatímanum og eftir hann eru gerðar athuganir og þær skráðar kerfisbundið og skal halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr. Athuga skal öll dýrin daglega og skrá merki um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara. Athuganir á dýrunum í búrunum skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð, til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs. Mæla skal fóðurát dýranna vikulega og vigta þau vikulega. Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í rannsókninni til að tryggja að

þeim fækki sem minnst, s.s. vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Í lok váhrifatímabilsins eru öll eftirlifandi dýr aflífuð og krufin. Dauðvona dýr skal fjarlægja og aflífa og kryfja þegar eftir þeim er tekið.

Eftirfarandi rannsóknir eru venjulega gerðar á öllum dýrunum, að samanburðardýrunum meðtöldum:

a) Augnskoðun með augnspegli eða öðru jafngildu tæki við hæfi skal framkvæma áður en kemur að váhrifum frá prófunarefninu og við lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin en a.m.k. dýrin í hópnum sem fær stærsta skammtinn og dýrin í samanburðarhópunum. Ef breytingar greinast í augum skulu öll dýrin skoðuð.

b) Blóðfræðilegar rannsóknir skal gera í lok prófunartímabilsins, þ.m.t. varðandi blóðkornaskil, blóðrauðastyrk, rauðkornafjölda, heildarhvítkornafjölda og deilitalningu hvítkorna og mælingu á storknunarhæfni, s.s. storknunartíma, próþrombíntíma, þrombóplastíntíma eða blóðflögufjölda.

c) Klínískar, lífefnafræðilegar mælingar á blóði skal gera í lok prófunartímabilsins. Jafnvægi rafkleyfra efna, kolvetnaefnaskipti og starfsemi lifrar og nýrna eru meðal þeirra þátta sem rétt þykir að kanna í öllum rannsóknunum. Val á sértækum greiningum ræðst af athugunum á verkunarhætti prófunarefnisins. Mælt er með því að eftirtaldir þættir verði greindir: kalsíum, fosfór, klóríð, natríum, kalíum, glúkósi eftir föstu (með viðeigandi föstutíma fyrir viðkomandi tegund), glútamínpýruvín-transamínasi í sermi ([1]), glútamínoxalóasetattransamínasi í sermi ([2]), ornitíndekarboxýlasi, gammaglútamýltranspeptíðasi, köfnunarefni í þvagefni, albúmín, kreatínín í blóði, heildarmagn gallrauða og heildarprótín í sermi. Aðrar mælingar, sem geta verið nauðsynlegar til þess að fullnægjandi eiturefnafræðilegt fáist, eru m.a. mælingar á lípíðum, hormónum, sýru- og basajafnvægi, methemóglóbíni og kólínesterasavirkni. Gera má fleiri klínískar, lífefnafræðilegar mælingar, ef nauðsyn krefur, til að rannsaka frekar þau áhrif sem koma fram.

d) Að jafnaði er ekki þörf á þvagrannsóknum nema fyrir liggi ábending sem er grundvölluð á eiturhrifum sem búist er við eða koma fram.

Ef rannsóknarsöguleg grunngögn eru ófullnægjandi skal yfirvega að mæla blóðfræðilegar og klínískar, lífefnafræðilegar breytur áður en skammtagjöf hefst.

Stórsæ krufning

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrunum og skal m.a rannsaka yfirborð líkamans, öll op og einnig kúpuhol, brjósthol og kviðarhol og innihald þeirra. Blautvigta skal lifur, nýru, nýrnahettur og eistu eins fljótt hægt er eftir krufningu, þ.e. áður en þau þorna. Eftirfarandi líffæri og vefir skulu varðveitt í hentugum miðli til að gera megi frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir síðar: allar stórsæjar vefjaskemmdir, lungu, sem skal fjarlægja í heilu lagi, vigta og meðhöndla með heppilegu festiefni til að tryggja að lungnabyggingin haldist (gegnflæði festiefnisins er álitin áhrifaríkt aðferð), vefir úr nefkoki, heili, þ.m.t. sneiðar af mænukylfu/heilabrú, hnykilbörkur og heilabörkur, heiladingull, skjaldkirtill/kalkkirtill, allur hóstarkirtilsvefur, barki, lungu, hjarta, ósæð, munnvatnskirtlar, lifur, milta, nýru, nýrnahettur, bris, kynkirtlar, leg, (aukalíffæri kynkerfis), (húð), gallblaðra (ef til staðar), vélinda, magi, skeifugörn, ásgörn, dausgörn, botnristill, ristill, endaþarmur, þvagblaðra, dæmigerður eitill, (mjólkurkirtill kvendýrs), (lærisvöðvakerfi), úttaug, (augu), bringubein með beinmergi, (lærleggur, með liðyfirborði) og (mæna í þremur hæðarflötum: háls-, brjóst- og lendarhluti). Vefina, sem nefndir eru innan sviga, þarf aðeins að rannsaka ef merki eru um eiturhrif eða ef þeir eru í tengslum við marklíffæri.

Vefjameinafræðileg rannsókn

a) Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á öndunarvegi og öðrum líffærum og vefjum allra dýra í samanburðarhópnum og í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

b) Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir.

c) Rannsaka skal marklíffæri í öðrum skammtahópum.

d) Einnig skal fara fram vefjameinafræðilega rannsókn á lungum dýra í hópunum sem fá litla og meðalstóra skammta þar eð það getur verið hentug aðferð til að meta heilsufar dýranna. Frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir er ekki nauðsynlegt að framkvæma reglubundið á dýrunum í

([1]) Núna þekktur sem alanínamínótransferasi í sermi.

([2]) Núna þekktur sem aspartatamínótransferasi í sermi.

þessum hópum en alltaf þarf að rannsaka þau líffæri sem sýna merki um skemmdir í hópnum sem fær stærsta skammtinn.

e) Ef notaður er fylgihópur skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á þeim vefjum og líffærum þar sem merki finnast um eiturhrif í hinum meðferðarhópunum.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, tegundir vefjaskemmda og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda. Meta skal niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður og fóður,

— prófunarskilyrði:

lýsing á váhrifabúnaði, þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til að framleiða agnir og úða, aðferð við loftstýringu, meðhöndlun á útblásturslofti og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa, ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og, eftir því sem við á, stöðugleika úðastyrkleika eða agnastærð.

Váhrifagögn: þessi gögn skulu sett í töflu, þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli loftsins),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) miðgildi agnastærðar (eftir því sem við á),

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og styrk,

— núlláhrifagildi ef unnt er,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— upplýsingar um fóður og líkamsþyngd,

— niðurstöður augnskoðunar,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og niðurstöður þeirra (þ.m.t. niðurstöður þvagrannsókna ef þær eru gerðar),

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.30. **PRÓFUN Á LANGVINNUM EITURHRIFUM**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er venjulega gefið nokkrum hópum tilraunadýra sjö daga í viku eftir viðeigandi ákomuleið og í tiltekinni skammtastærð fyrir hvern hóp megnið af líftíma dýranna. Meðan á váhrifum frá prófunarefninu stendur og eftir það eru tilraunadýrin athuguð daglega til að kanna hvort merkja um eiturhrif verði vart.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Verkferli*

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa.

1.6.2. *Prófunarskilyrði*

1.6.2.1. Tilraunadýr

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin.

Nota má aðrar tegundir (nagdýr eða önnur dýr) ef niðurstöður úr fyrri rannsóknum styðja það. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum og hefja skammtagjöf eins fljótt og auðið er eftir fráfærur.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalgildinu. Ef rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum um munn er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sömu tegund/kyni og stofni í báðum rannsóknunum.

1.6.2.2. Fjöldi og kyn

Ef tilraunadýrið er nagdýr skal nota minnst 40 dýr (20 kvendýr og 20 karldýr) fyrir hverja skammtastærð og samskeiða samanburðarhóp. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar.

Ef um er að ræða önnur dýr en nagdýr mega dýrin vera færri en þó ekki færri en fjögur af hvoru kyni í hverjum hópi.

1.6.2.3. Skammtastærðir og tíðni váhrifa

Nota skal minnst þrjár skammtastærðir auk samskeiða samanburðarhóps. Stærsti skammturinn ætti að kalla fram greinileg merki um eiturhrif án þess að valda verulega hárri dánartíðni.

Minnsti skammturinn ætti ekki að framkalla nein merki um eiturhrif.

Stærð milliskammts (-skammta) á að vera mitt á milli stærstu og minnstu skammtanna.

Við val á skammtastærðum skal taka tillit til gagna úr fyrri eiturhrifaprófunum og -rannsóknum.

Venjulega eru dýrin látin verða fyrir váhrifum daglega. Ef íðefnið er gefið í drykkjarvatni eða blandað í fóður skulu dýrin ávallt hafa aðgang að vatninu eða fóðrinu.

1.6.2.4. Samanburðarhópar

Nota skal samskeiða samanburðarhóp sem er ekki látinn verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu en er að öðru leyti alveg eins og meðferðarhóparnir.

Við sérstakar aðstæður, s.s. í innöndunarrannsóknum með úðum eða þegar notað erýruefni með óskilgreindri, lífvirkni í rannsóknum með inngjöf um munn, skal einnig nota samskeiða, neikvæðan samanburðarhóp. Neikvæði samanburðarhópurinn er meðhöndlaður alveg á sama hátt og prófunarhóparnir nema að því leyti að dýrin eru hvorki látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu né burðarefni.

1.6.2.5. Íkomuleið

Tvær helstu íkomuleiðirnar eru um munn og við innöndun. Val á íkomuleið fer eftir eðlis- og efnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins og líklegri váhrifaleið hjá mönnum.

Notkun íkomuleiðar um húð veldur talsverðum erfiðleikum í framkvæmd. Venjulega er hægt að álykta um langvinn, altæk eiturhrif, sem stafa af upptöku um húð, út frá niðurstöðum úr prófuninni með inngjöf um munn ásamt vitneskju um magnið sem er tekið upp um húðina samkvæmt niðurstöðum úr fyrri eiturhrifaprófunum á upptöku um húð.

1.6.2.6. Rannsóknir með inngjöf um munn

Ef prófunarefnið frásogast frá meltingarvegi og ef menn geta orðið fyrir váhrifum við inntöku um munn er æskilegasta íkomuleiðin inngjöf um munn nema vitað sé um frábendingar. Dýrin mega fá prófunarefnið með fóðri, uppleyst í drykkjarvatni eða í hylkjum. Best er dagleg skömmtun sjö daga í viku vegna þess að skömmtun fimm daga í viku getur orðið til þess að dýrin nái sér aftur eða fái fráhvarfseinkenni milli váhrifatímabilanna sem hefur áhrif á niðurstöðuna og mat á henni. Af hagkvæmnisástæðum fyrst og fremst er skömmtun fimm daga í viku þó talin ásættanleg.

1.6.2.7. Innöndunarrannsóknir

Þar eð innöndunarrannsóknir hafa í för með sér flóknari tæknivandamál en rannsóknir með öðrum íkomuleiðum eru hér gefnar ítarlegri leiðbeiningar um þessa aðferð við gjöf. Athygli er einnig vakin á því að ídreyping í barka getur verið raunhæfur valkostur við tilteknar aðstæður.

Langtímaváhrif eru að jafnaði annaðhvort skipulögð í samræmi við áætluð váhrif á menn, og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í sex klukkustundir á dag, eftir að styrkurinn í klefanum hefur náð jafnvægi, fimm daga í viku (ósamfelld váhrif), eða skipulögð með tilliti til hugsanlegra váhrifa úr umhverfinu og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í 22–24 klukkustundir á dag, sjö daga í viku (samfelld váhrif), með u.þ.b. klukkustund daglega á svipuðum tíma til að fóðra dýrin og hreinsa klefann.

Í báðum tilvikum eru dýrin að jafnaði látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í föstum styrkleikum. Meginmunurinn á ósamfelldum og samfelldum váhrifum er að í fyrra tilvikinu fá dýrin 17–18 klukkustunda tímabil án váhrifa, þar sem þau geta náð sér eftir áhrifin af váhrifum dagsins, og jafnvel lengra batatímabil um helgar.

Valið milli ósamfelldra eða samfelldra váhrifa er háð markmiðum rannsóknarinnar og þeim váhrifum á menn sem líkja á eftir. Hinsvegar þarf að hafa í huga tiltekna tæknilega örðugleika. Til dæmis getur

nauðsyn þess að brynna dýrunum og fóðra þau á váhrifatímanum, sem og þörfin fyrir flóknari (og áreiðanlegri) tækni við myndun og vöktun úða og gufu, vegið upp á móti kostum þess að nota samfelld váhrif til að líkja eftir umhverfisaðstæðum.

1.6.2.8. Váhrifaklefar

Dýrin skulu prófuð í innöndunarklefum sem eru hannaðir til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Samanburðar- og váhrifaklefar skulu vera eins byggðir og hannaðir til að tryggja að váhrifaaðstæður séu að öllu leyti sambærilegar nema að því er varðar váhrifin frá prófunarefninu. Venjulega er vægum undirþrýstingi haldið í klefanum til að koma í veg fyrir að prófunarefnið leki út í aðliggjandi svæði. Klefinn skal hannaður þannig að ekki verði of þröngt um tilraunadýrin. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli klefans.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

i. Loftstreymi: helst skal stöðugt vakta hraða loftstreymis gegnum klefann.

ii. Styrkur: á daglega váhrifatímabilinu má styrkur prófunarefnisins ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu.

iii. Hiti og raki: fyrir nagdýr ber að halda hitastigi við 22 ± 2 °C og raka inni í klefanum við 30–70% nema þegar vatn er notað til að dreifa prófunarefninu í andrúmslofti klefans. Helst skal stöðugt vakta bæði hita og raka.

iv. Mælingar á agnastærð: ákvarða skal stærðardreifingu agna í andrúmslofti klefa þar sem fljótandi eða föst úðaefni eru notuð. Stærð úðaagnanna skal vera slík að tilraunadýrin, sem eru notuð, geti andað þeim inn. Sýni af andrúmslofti klefans skulu tekin á öndunarsvæði dýranna. Loftsýnin skulu vera dæmigerð fyrir dreifingu agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, og með fellingar-mælingum skal vera unnt að lýsa öllu svifúðaefninu á grundvelli þessara sýna, jafnvel þegar mikið af úðaefninu er ekki innöndunarhæft. Gera skal tíðar greiningar á agnastærð meðan verið er að þróa úðunarkerfið, til að tryggja stöðugleika úðans, og síðan eins oft og nauðsynlegt er meðan á váhrifum stendur til að greina með fullnægjandi hætti hvort dreifing agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, er jöfn.

1.6.2.9. Lengd rannsóknartíma

Skömmtunartímabilið ætti að vera minnst 12 mánuðir.

1.6.3. *Verkferli*

Athuganir

Vandleg, klínísk skoðun skal fara fram a.m.k. einu sinni á dag. Aðrar athuganir skal gera daglega ásamt viðeigandi ráðstöfunum til að lágmarka tap dýra úr rannsókninni, t.d. skal kryfja eða kæla dýr, sem finnast dauð, og einangra eða aflífa veik eða dauðvona dýr. Gera skal vandlegar athuganir til að greina hvenær hvers kyns eiturhrif koma fram og hvernig þau þróast, sem og til að lágmarka tap á dýrum vegna sjúkdóma, sjálfsrofs eða sjálfsafráns.

Skrá skal klínísk einkenni fyrir öll dýrin, þ.m.t. taugafræðilegar breytingar og breytingar í augum, sem og dánarhlutfall. Skrá skal upphafstíma og þróun eitrunareinkenna, þ.m.t. grun um æxlisvöxt.

Skrá skal líkamsþyngd hvers dýrs einu sinni í viku fyrstu 13 vikur prófunartímans og a.m.k. einu sinni á fjögurra vikna fresti eftir það. Mæla skal fóðurát vikulega fyrstu 13 vikur rannsóknarinnar og síðan á u.þ.b. þriggja mánaða fresti nema heilbrigðisástand eða líkamsþyngd gefi tilefni til annars.

Blóðrannsókn

Gera skal blóðrannsókn (t.d. varðandi blóðrauðainnihald, blóðkornaskil, heildarfjölda rauðkorna, heildarfjölda hvítkorna, blóðflögur eða aðrar mælingar á storknunarhæfni), eftir þrjá mánuði og sex mánuði og síðan á u.þ.b. sex mánaða fresti og í lok rannsóknarinnar, á blóðsýnum sem safnað er frá öllum dýrum, sem ekki eru nagdýr, og frá 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópum. Ef unnt er skulu sýnin tekin úr sömu rottunum í hvert skipti. Að auki skal taka forprófunarsýni úr öðrum dýrum en nagdýrum.

Ef klínískar athuganir benda til versnandi heilsu dýranna meðan á rannsókninni stendur skal gera deilitalningu í blóðsýnum úr viðkomandi dýrum.

Gera skal deilitalningu í blóðsýnum úr dýrunum í hópnum sem fær stærsta skammtinn og í samanburðarhópunum. Deilitalningar í blóðsýnum eru einungis gerðar fyrir hópinn eða hópana sem fá næststærsta skammtinn ef mikið ósamræmi er milli hópsins sem fær stærsta skammtinn og samanburðarhópanna eða ef meinafræðilegar niðurstöður gefa tilefni til þess.

Þvagrannsóknir

Safna skal þvagsýnum til greiningar úr öllum dýrum sem eru ekki nagdýr og úr 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópunum, ef unnt er úr sömu rottunum og í blóðrannsókninni og með sama millibili og sýni eru tekin þar. Gera skal greiningar varðandi eftirfarandi atriði, annaðhvort á sýni úr hverju dýri um sig eða, þegar um nagdýr er að ræða, á safnsýni úr hvoru kyni í hverjum hópi:

— útlit, rúmmál og þéttleika fyrir hvert dýr,

— prótín, glúkósa, ketón og blóðmigu (hálfmegindlega),

— botnfall, með smásjárrannsókn (hálfmegindlega),

Klínísk efnafræði

Blóðsýni fyrir klínískar, efnafræðilegar mælingar eru tekin á u.þ.b sex mánaða fresti og í lok rannsóknarinnar úr öllum dýrum sem eru ekki nagdýr og úr 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópunum, helst úr sömu rottunum hverju sinni. Að auki skal taka forprófunarsýni úr öðrum dýrum en nagdýrum. Blóðvökvi er útbúinn úr þessum sýnum og gerðar greiningar varðandi eftirfarandi:

— heildarprótínstyrk,

— albúmínstyrk,

— prófanir á lifrarstarfsemi (s.s. virkni basískra fosfatasa, glútamínpýruvíntransamínasa ([1]) og glútamínoxalóasetattransamínasa ([2]), gammaglútamýltranspeptíðasa og ornitíndekarboxýlasa),

— kolvetnaefnaskipti, s.s. glúkósa í blóði eftir föstu,

— prófanir á virkni nýrna, s.s. köfnunarefni úr þvagefni í blóði.

Stórsæ krufning

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrunum, þ.m.t. þeim sem drepast meðan á tilrauninni stendur eða finnast dauðvona og eru því aflífuð. Fyrir aflífun skal taka blóðsýni úr öllum dýrum til deilitalningar. Varðveita skal allar auðsýnilegar vefjaskemmdir, æxli eða vefjabreytingar sem grunur er um að séu æxli. Leitast skal við að tengja stórsæjar athuganir við niðurstöður smásjárrannsókna.

Varðveita skal öll líffæri og vefi fyrir vefjameinafræðilega rannsókn. Þetta á yfirleitt við um eftirfarandi líffæri og vefi: heila ([3]) (mænukylfu/heilabrú, hnykilbörk, heilabörk), heiladingul, skjaldkirtil (þ.m.t. kalkkirtil), hóstarkirtil, lungu (þ.m.t. barka), hjarta, ósæð, munnvatnskirtla, lifur ([3]), milta, nýru ([3]), nýrnahettur ([3]), vélinda, maga, skeifugörn, ásgörn, dausgörn, botnristil, ristil, endaþarm, leg, þvagblöðru, eitla, bris, kynkirtla ([3]), aukalíffæri kynkerfis, mjólkurkirtla kvendýra, húð, vöðvakerfi, úttaug, mænu (háls-, brjóst- og lendarhluta), bringubein með beinmergi, lærlegg (þ.m.t. liðamót) og augu. Besta leiðin til að varðveita lungu og þvagblöðru er að fylla þessa vefi með festiefni; í innöndunarrannsóknum er fylling lungnanna forsenda þess að unnt sé að gera viðeigandi vefjameinafræðilega rannsókn. Í sérstökum rannsóknum á borð við innöndunarrannsóknir skal rannsaka allan öndunarveginn, þ.m.t. nef, kok og barkakýli.

([1]) Núna þekktur sem alanínamínótransferasi í sermi.

([2]) Núna þekktur sem aspartatamínótransferasi í sermi.

([3]) Vigta skal þessi líffæri sem eru tekin úr 10 dýrum af hvoru kyni í hverjum hópi þegar um er að ræða nagdýr og öll dýr sem eru ekki nagdýr, auk skjaldkirtils (ásamt kalkkirtli) allra dýra sem eru ekki nagdýr.

Ef aðrar klínískar rannsóknir fara fram eiga upplýsingar úr þeim að liggja fyrir áður en smásjárrannsókn er gerð þar eð þær geta gefið meinafræðingnum mikilvægar leiðbeiningar.

Vefjameinafræði

Allar sýnilegar breytingar ber að skoða í smásjá, sérstaklega æxli og aðrar vefjaskemmdir í hvaða líffæri sem er. Að auki er mælt með eftirfarandi verkferlum:

a) Smásjárrannsókn á öllum varðveittum líffærum og vefjum með tæmandi lýsingu á öllum vefjaskemmdum sem greinast hjá:

1. öllum dýrum sem drápust eða voru aflífuð meðan á rannsókninni stóð,

2. öllum dýrum í hópnum sem fékk stærsta skammtinn og í samanburðarhópunum.

b) Líffæri og vefir, sem eru afbrigðilegir af völdum prófunarefnisins eða eru hugsanlega afbrigðilegir af völdum þess, eru einnig rannsakaðir hjá hópunum sem fá minni skammta.

c) Ef niðurstaða prófunarinnar bendir til verulegrar styttingar á eðlilegum líftíma dýranna eða virkjun áhrifa sem gætu haft áhrif á eiturhrifasvörun skal rannsaka hópinn, sem fær næsta skammt fyrir neðan, á þann hátt sem lýst er hér að framan.

d) Upplýsingar um eðlilega tíðni vefjaskemmda í dýrastofninum sem er notaður, við sömu rannsóknaraðstæður, þ.e. rannsóknarsöguleg samanburðargögn, eru forsenda þess að unnt sé að meta mikilvægi þeirra breytinga sem sjást hjá meðferðardýrunum.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram og hundraðshluti dýra með hverja tegund vefjaskemmda. Meta skal niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður og fóður,

— prófunarskilyrði:

Lýsing á váhrifabúnaði:

þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til að framleiða agnir og úða, aðferð við loftstýringu, meðhöndlun á útblásturslofti og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og, eftir því sem við á, stöðugleika úðastyrkleika eða agnastærð.

Váhrifagögn:

Þessi gögn skulu sett í töflu, þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli loftsins),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) miðgildi agnastærðar (eftir því sem við á),

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað) og styrkleikar,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti,

— núlláhrifagildi,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— upplýsingar um fóður og líkamsþyngd,

— niðurstöður augnskoðunar,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim (þ.m.t. úr þvagrannsóknum, ef þær eru gerðar),

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, ef unnt er,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.31. RANNSÓKN Á EITURHRIFUM Á ÞROSKUN Á FORBURÐARSKEIÐI

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 414 um prófanir (2001).

1.1. INNGANGUR

Þessi aðferð til prófunar á eiturhrifum á þroskun er hönnuð með það fyrir augum að afla almennra upplýsinga um váhrif á tilraunadýr með fangi og á lífverur á þroskunarskeiði í móðurlífi; undir þetta getur fallið mat á áhrifum á móður, svo og dauði, frávik í líkamsbyggingu og vaxtarbreyting fósturs. Þótt starfræn skerðing sé mikilvægur þáttur í þroskun er rannsókn á henni ekki fastur liður í þessari aðferð. Starfræna skerðingu má prófa í sérrannsókn eða sem viðbót við þessa rannsókn og þá með prófunaraðferðinni fyrir taugaeiturhrif á þroskun. Að því er varðar upplýsingar um prófanir á starfrænni skerðingu og öðrum áhrifum á lífverur eftir fæðingu vísast til aðferðanna sem notaðar eru við rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun hjá tveimur kynslóðum og rannsókn á taugaeiturhrifum á þroskun, eftir því sem við á.

Nauðsynlegt kann að reynast að laga þessa prófunaraðferð sérstaklega að einstökum tilvikum á grundvelli sértækrar þekkingar, t.d. á eðlisefnafræðilegum eða eiturefnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins. Slík aðlögun er við hæfi ef fyrir liggja sannfærandi, vísindaleg gögn þess efnis að aðlögunin leiði til þess að betri upplýsingar fáist úr prófuninni. Þegar svo er skal gera ítarlega grein fyrir þessum vísindalegu gögnum í rannsóknarskýrslunni.

1.2. SKILGREININGAR

Eiturefnafræði þroskunar: rannsókn á skaðlegum áhrifum á lífveru á þroskunarskeiði sem kunna að stafa af váhrifum fyrir getnað, á fósturþroskunarskeiði eða eftir fæðingu og fram að kynþroska. Helstu birtingarform eiturhrifa á þroskun eru 1) dauði lífverunnar, 2) óeðlilegt frávik í líkamsbyggingu, 3) vaxtarbreyting og 4) starfræn skerðing. Áður var eiturefnafræði þroskunar oft kölluð vanskapanafræði.

Skaðleg áhrif: meðferðartengd frávik frá grunnviðmiðun sem minnkar hæfni lífveru til að lifa af, fjölga sér eða laga sig að umhverfinu. Eiturefnafræði þroskunar í víðasta skilningi nær yfir öll áhrif sem raska eðlilegri þroskun fangs, jafnt fyrir sem eftir burð.

Breyting á vexti: breyting á þyngd eða stærð líffæris eða líkama afkvæmis.

Breytingar (frábrigði): byggingarlegar breytingar í þroskun sem taka bæði til vansköpunar og afbrigða (28. heimild).

Vansköpun/stórvægilegt frávik: breyting í líkamsbyggingu sem telst skaðleg fyrir dýrið (getur einnig verið banvæn) og er yfirleitt sjaldgæf.

Afbrigði/smávægilegt frávik: breyting í líkamsbyggingu sem telst hafa lítil sem engin skaðleg áhrif á dýrið og getur verið tímabundin og tiltölulega algeng í samanburðarþýðinu.

Fang (e. *conceptus*): frjóvgað egg og allt sem því tilheyrir á hvaða þroskunarstigi sem er frá frjóvgun til fæðingar, þ.m.t. fósturhimnur sem og fósturvísirinn eða fóstrið.

Hreiðrun (bólfesta): festing kímblöðru við þekjuvef legs, þ.m.t. gegnþrenging hennar í legþekju og greyping hennar í legslímhúð.

Fósturvísir: fyrsta þroskunarstig lífveru, nánar tiltekið það stig sem þroskast úr frjóvguðu eggi eftir að langásinn myndast og þar til öll helstu líffæri hafa myndast.

Eiturhrif á fósturvísi: áhrif sem skaða eðlilega byggingu, þroskun, vöxt og/eða lífvænleika fósturvísis.

Fóstur: óborið afkvæmi eftir fósturvísisskeið.

Eiturhrif á fóstur: áhrif sem skaða eðlilega byggingu, þroskun, vöxt og/eða lífvænleika fósturs.

Fósturlát: ótímabær missir fangs, þ.e. fósturvísis eða ólífvænlegs fósturs, úr legi.

Fósturvisnun: fang sem, eftir hreiðrun í legi og fósturdauða, hefur orðið fyrir visnun eða upplausn.

Snemmkomin visnun: merki um hreiðrun án greinanlegs fósturvísis eða fósturs.

Síðkomin visnun: andvana fósturvísir eða fóstur með merki um útvortis hrörnunarbreytingar.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn eða hæsta váhrifastigið sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Efnið er yfirleitt gefið dýrum með fangi, a.m.k. á tímanum frá hreiðrun fram að deginum á undan áætluðum aflífunardegi sem skal vera eins nálægt eðlilegum gotdegi og unnt er án þess að hætta sé á því að gögn fari forgörðum vegna gots fyrir tímann. Tilgangurinn með prófunaraðferðinni er ekki að rannsaka einungis tímabilið þegar líffærin myndast (t.d. 5.–15. dag hjá nagdýrum og 6.– 18. dag hjá kanínum) heldur einnig áhrifin frá því fyrir hreiðrun, eftir því sem við á, og allan meðgöngutímann fram að deginum á undan keisaraskurði. Stuttu fyrir keisaraskurð eru kvendýrin aflífuð, leginnihaldið rannsakað og fóstrin metin með tilliti til sýnilegra frábrigða og breytinga í mjúkvef og beinagrind.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Val á dýrategund**

Mælt er með því að prófunin sé gerð á þeirri dýrategund sem hentar best og að notaðar séu tegundir og stofnar tilraunadýra sem algengast er að nota í prófunum á eiturhrifum á þroskun á forburðarskeiði. Rottur eru ákjósanlegasta nagdýrategundin en ef nagdýr eru ekki notuð eru kanínur ákjósanlegasta tegundin. Ef notaðar eru aðrar dýrategundir skal það rökstutt.

1.5.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 ºC) fyrir nagdýr og 18 (±3) ºC fyrir kanínur. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

Pörun skal fara fram í búrum sem til þess henta. Æskilegt er að hvert parað dýr sé í sérstöku búri en einnig er heimilt að hafa litla hópa saman í búri.

1.5.3. **Undirbúningur dýra**

Nota skal heilbrigð dýr sem hafa verið látin venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. 5 daga og hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna. Dýrin í öllum prófunarhópunum skulu vera svo svipuð sem unnt er að þyngd og aldri. Fyrir hverja skammtastærð skal nota ung, fullvaxin, eibær kvendýr. Kvendýrin skulu pöruð við karldýr af sömu tegund og stofni en varast skal að para systkini saman. Hjá nagdýrum telst dagurinn, þegar vart verður við leggangatappa og/eða sæði, vera núlldagur meðgöngu; hjá kanínum er núlldagur yfirleitt dagur mökunar eða sæðingardagur ef sú tækni er notuð. Pöruðum kvendýrum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hverju dýri skal úthlutað einkvæmu auðkennisnúmeri. Pöruðum kvendýrum skal skipað af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa og ef kvendýrin eru pöruð í lotum skal skipta dýrunum úr hverri lotu jafnt á hópana. Einnig skal skipta kvendýrum, sem sama karldýrið hefur gagnast, jafnt á hópana.

1.6. VERKFERLI

1.6.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Í hverjum prófunar- og samanburðarhópi skulu vera nógu mörg kvendýr að u.þ.b. 20 kvendýr, sem fest hafa fang, verði til krufningar. Ef færri en 16 dýr í hópi hafa fest fang kann það að þykja ófullnægjandi. Ekki er sjálfgefið að dánarhlutfall kvendýra með fangi ógildi rannsóknina svo fremi að það fari ekki yfir u.þ.b. 10%.

1.6.2. **Tilreiðsla skammta**

Ef notað er burðarefni eða annað íblöndunarefni til að auðvelda skömmtun, skal hafa eftirfarandi í huga: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti og geymd eða útskilnað prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins sem kunna að breyta eitureiginleikum þess og áhrif á fóðurát og vatnsdrykkju eða á næringarástand dýranna. Burðarefnið skal hvorki valda eiturhrifum á þroskun né hafa áhrif á æxlun.

1.6.3. **Skömmtun**

Að jafnaði skal gefa prófunarefnið daglega frá hreiðrun (t.d. á 5. degi frá pörun) og fram að deginum á undan áætluðum keisaraskurði. Ef forrannsóknir liggja fyrir og benda ekki til mikillar hættu á fanglosi fyrir hreiðrun má lengja meðferðina þannig að hún nái yfir allan meðgöngutímann frá mökun og fram að deginum á undan áætluðum aflífunardegi. Það er alkunna að röng meðhöndlun eða streita á meðgöngutíma getur komið af stað ótímabæru fanglosi. Reynt skal að komast hjá bæði óþarfri meðhöndlun dýra með fangi sem og streitu af utanaðkomandi orsökum, s.s. hávaða, til að koma í veg fyrir ótímabært fanglos af völdum þátta sem tengjast ekki meðferðinni.

Nota skal a.m.k. þrjár skammtastærðir og samskeiða samanburð. Heilbrigðum kvendýrum skal skipað af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa. Skammtastærðum skal dreift þannig að þær framkalli stigskipt eiturhrif. Svo fremi að eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunarefnisins setji því ekki skorður skal val á stærsta skammtinum miðast við að kalla fram einhver eiturhrif á þroskun og/eða á móður (klínísk einkenni eða minnkun líkamsþyngdar) en hvorki dauða né miklar þjáningar. Æskilegt er að a.m.k. ein milliskammtastærð framkalli minnstu merkjanlegu eiturhrifin. Minnsti skammtur ætti ekki að framkalla nein merki um eiturhrif á móður eða á þroskun. Velja skal röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og ákvarða skammtastærð þar sem engin merkjanleg, skaðleg áhrif koma fram (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10). Þótt markmiðið sé að ákveða mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif fyrir mæður má einnig samþykkja rannsóknir þar sem slík mörk eru ekki ákvörðuð (1. heimild).

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum fyrirliggjandi gögnum um eiturhrif auk viðbótar-upplýsinga um efnaskipti og eiturefnahvörf prófunarefnisins eða skyldra efna. Þessar upplýsingar koma einnig að gagni við að sýna fram á að skömmtunaráætlunin sé fullnægjandi.

Nota skal samskeiða samanburðarhóp. Sá hópur skal vera samanburðarhópur sem fær sýndarmeðferð eða samanburðarhópur sem fær eingöngu burðarefni ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Öllum hópunum skal gefið sama rúmmál, annaðhvort af prófunarefni eða burðarefni. Dýrin í samanburðar-hópnum eða -hópunum skulu meðhöndluð á sama hátt og dýrin í prófunarhópnum. Í samanburðarhópum, sem fá eingöngu burðarefni, skal gefa mesta magn burðarefnis sem er notað (eins og í prófunarhópnum sem fær minnsta skammtinn).

1.6.4. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram hjá kvendýrum með fangi eða afkvæmum þeirra í prófun með gjöf um munn og einni skammtastærð sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin, sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef áhrifa er ekki að vænta samkvæmt fyrirliggjandi gögnum (t.d. um efnasambönd sem eru skyld að byggingu eða efnaskiptum) kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta við gjöf um munn í markprófuninni. Þegar ákomuleið er önnur, t.d. við innöndun eða um húð, geta eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnisins oft gefið til kynna og takmarkað váhrifastigið sem unnt er að ná að hámarki (t.d. ætti áburður á húð ekki að valda miklum, staðbundnum eiturhrifum).

1.6.5. **Gjöf skammta**

Prófunarefnið eða burðarefnið er venjulega gefið um munn með slöngu. Sé notuð önnur ákomuleið skal prófandinn rökstyðja það og tilgreina ástæðurnar fyrir vali sínu og gera viðeigandi breytingar ef nauðsyn krefur (2.–4. heimild). Prófunarefnið skal gefið á því sem næst sama tíma dag hvern.

Skammturinn, sem hvert dýr fær, skal að jafnaði miðast við nýjustu ákvörðunina á líkamsþyngd þess. Þó skal sýna varkárni þegar skammturinn er leiðréttur á síðasta þriðjungi meðgöngu. Nota skal fyrirliggjandi gögn við val á skammtastærð til að koma í veg fyrir kröftug eiturhrif á mæður. Ef vart verður kröftugra eiturhrifa hjá mæðrum í meðferðinni skal aflífa þær á mannúðlegan hátt. Ef mörg kvendýr með fangi sýna merki um kröftug eiturhrif kemur til greina að hætta við hópinn sem fær þann skammt. Ef efnið er gefið í maga er best að það sé gert í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Hámarksrúmmál vökva, sem unnt er að gefa í einu, ræðst af stærð tilraunadýrsins. Rúmmálið ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef maísolía er notuð sem burðarefni má rúmmálið ekki vera meira en 0,4 ml/100 g líkamsþyngdar. Halda skal rúmmálsfrávikum í lágmarki með því að stilla styrkleikana þannig að rúmmálið haldist stöðugt fyrir allar skammtastærðir.

1.6.6. **Athugun á mæðrum**

Gera skal og skrá klínískar athuganir a.m.k. einu sinni á dag, helst á sama tíma eða sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Skrá skal ástand dýranna, þ.m.t. dánarhlutfall, hlutfall dauðvona dýra, breytingar á atferli sem máli skipta og öll augljós merki eiturhrifa.

1.6.7. **Líkamsþyngd og fóðurát**

Vigta skal dýrin á núlldegi meðgöngu, en eigi síðar en á 3. degi meðgöngu ef um er að ræða dýr frá utanaðkomandi ræktanda sem eru pöruð á tilteknum tíma, og síðan á fyrsta degi skömmtunar og a.m.k. þriðja hvern dag á skömmtunartímabilinu og á áætluðum aflífunardegi.

Fóðurát skal skrá með þriggja daga millibili á sömu dögum og dýrin eru vigtuð.

1.6.8. **Skoðun eftir aflífun**

Kvendýr skulu aflífuð daginn áður en þess er vænst að þau gjóti. Kvendýr, sem sýna merki um fósturlát eða ótímabært got fyrir áætlaðan aflífunardag, skulu aflífuð og skoðuð í nákvæmri, stórsærri rannsókn.

Skoða skal mæður með berum augum þegar rannsókn lýkur eða ef dýrið drepst í rannsókninni til að leita að frávikum í líkamsbyggingu eða sjúklegum breytingum. Mat á mæðrum við keisaraskurð og eftirfylgjandi fósturgreining skulu helst gerð án vitneskju um í hvaða meðferðarhópi þau eru til að halda bjögun í lágmarki.

1.6.9. **Rannsókn á innihaldi legs**

Um leið og meðferð dýra er lokið eða sem fyrst eftir dauða þeirra skal fjarlægja legið og ganga úr skugga um hvort dýrin séu með fangi eða ekki. Skoða skal betur leg úr dýrum sem virðast ekki með fangi (t.d. með ammoníumsúlfíðblettun, ef um nagdýr er að ræða, og Salewski-blettun eða annarri hentugri aðferð ef um kanínur er að ræða) til að staðfesta fangleysi dýranna (5. heimild).

Vigta skal leg úr dýrum með fangi, að leghálsinum meðtöldum. Ekki skal vigta leg úr dýrum með fangi hafi dýrin drepist í rannsókninni.

Ákvarða skal fjölda gulbúa hjá kvendýrum með fangi.

Skoða skal innihald legs til að kanna fjölda dauðra fósturvísa eða fóstra og fjölda lífvænlegra fóstra. Lýsa skal því hversu langt fóðurvisnun er komin svo að unnt sé að áætla líklega dauðastund fangsins (sjá lið 1.2).

1.6.10. **Rannsókn á fóstrum**

Ákvarða skal kyn og líkamsþyngd hvers fósturs.

Rannsaka skal hvert fóstur með tilliti til ytri breytinga (6. heimild).

Fóstur skulu rannsökuð með tilliti til breytinga á beinagrind og mjúkvef (t.d. afbrigði og vansköpun eða frábrigði) (7.–24. heimild). Helst skal flokka fósturbreytingar þótt þess sé ekki krafist. Að lokinni flokkun

skal gera skýra grein fyrir viðmiðunum við skilgreiningu hvers flokks. Gefa skal sérstakan gaum að æxlunarfærum og skoða hvort þar sjáist merki um frávik frá eðlilegri þroskun.

Þegar um nagdýr er að ræða skal undirbúa og rannsaka u.þ.b. helming af hverju goti með tilliti til breytinga á beinagrind. Afganginn skal undirbúa og rannsaka með tilliti til breytinga á mjúkvef og nota til þess viðurkenndar eða viðeigandi raðsneiðingaraðferðir eða vandaðar aðferðir til stórsærrar krufningar.

Ef um er að ræða önnur dýr en nagdýr, t.d. kanínur, skal rannsaka öll fóstur með tilliti til breytinga, bæði á mjúkvef og beinagrind. Meta skal líkama þessara fóstra með vandlegri krufningu til að kanna breytingar á mjúkvef en undir þetta kunna að falla aðferðir til frekara mats á innri byggingu hjartans (25. heimild). Fjarlægja skal hausana á helmingi fóstranna, sem eru rannsökuð á þennan hátt, og undirbúa þau fyrir mat á breytingum í mjúkvef (þ.m.t. augu, heili, nefgöng og tunga) með stöðluðum raðsneiðingaraðferðum (26. heimild) eða annarri jafnnæmri aðferð. Undirbúa skal og rannsaka líkama þessara fóstra og ósnertu fóstrin, sem eftir eru, með tilliti til breytinga á beinagrind og nota til þess sömu aðferð og lýst var fyrir nagdýr.

2. GÖGN

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn fyrir hverja móður og afkvæmi hennar og taka þau saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp og hverja kynslóð, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, og hvers konar athuganir voru gerðar á fósturvísum/fóstrum, auk allra gagna um gotið sem máli skipta.

Meta skal tölulegar niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð og nota gotið sem einingu fyrir gagnagreiningu. Nota skal almennt viðurkennda tölfræðiaðferð og skal val á tölfræðiaðferðum vera liður í hönnun rannsóknarinnar og vera rökstutt. Einnig skal skýra frá gögnum um dýr sem lifðu ekki fram að áætluðum aflífunardegi. Þessi gögn má taka inn í hópmeðaltalið, ef við á. Rökstyðja skal og meta, í hverju tilviki fyrir sig, hvert sé vægi gagnanna um þessi dýr og þar með hvort þau skuli höfð með í hópmeðaltali eða -meðaltölum eða sleppt.

2.2. MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal niðurstöður úr rannsóknum á eiturhrifum á þroskun á forburðarskeiði út frá þeim áhrifum sem vart varð. Í matinu skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram:

— prófunarniðurstöður fyrir móður og fósturvísi eða fóstur, þ.m.t. hvort samband ríkir milli váhrifa prófunarefnisins á dýrin annars vegar og tíðni og alvarleika allra niðurstaðna hins vegar,

— viðmiðanir sem eru notaðar til að flokka ytri mjúkvef fósturs og breytingar á beinagrind, hafi flokkun farið fram,

— rannsóknarsöguleg samanburðargögn, ef við á, til að styrkja túlkun rannsóknarniðurstaðna,

— tölurnar sem eru notaðar til að reikna út öll hundraðshlutföll eða stuðla,

— fullnægjandi tölfræðigreining á rannsóknarniðurstöðum, ef við á, með nógu miklum upplýsingum um greiningaraðferðina til að óháður rýnir/tölfræðingur geti endurmetið og endurgert greininguna.

Í öllum rannsóknum, þar sem sýnt er fram á að eiturhrif eru engin, kemur til greina að gera frekari kannanir til að staðfesta frásog og lífaðgengi prófunarefnisins.

2.3. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Við rannsókn á eiturhrifum á þroskun á forburðarskeiði fást upplýsingar um áhrif endurtekinna váhrifa frá tilteknu efni á kvendýr með fangi og á þroskun afkvæma þeirra í leginu. Niðurstöður rannsóknarinnar ber að túlka í samhengi við niðurstöður úr rannsóknum á hálflangvinnum eiturhrifum, skaðlegum áhrifum á

æxlun, rannsóknum á eiturefnahvörfum og öðrum rannsóknum. Þar eð áhersla er bæði lögð á endapunkta fyrir almenn eiturhrif á móður og eiturhrif á þroskun gera niðurstöðurnar úr rannsókninni kleift að greina að ákveðnu marki á milli þeirra áhrifa á þroskun, sem koma fram þótt ekki sé um almenn eiturhrif að ræða, og áhrifa sem koma aðeins fram þegar skammtarnir eru einnig eitraðir fyrir móðurina (27. heimild).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— auðkennisgögn, þ.m.t. CAS-númer ef það er þekkt eða til,

— hreinleiki.

Burðarefni (ef við á):

— rökstuðningur fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

— tegund og stofn sem eru notuð,

— fjöldi og aldur dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður, styrkinn sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— umhverfisskilyrði,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

Niðurstöður:

Gögn um eiturhrifasvörun hjá mæðrum miðað við skammtastærð, þ.m.t. en ekki einvörðungu:

— gögn um fjölda dýra í upphafi prófunar, fjölda dýra sem lifðu af, fjölda kvendýra með fangi, fjölda fósturláta og fjölda kvendýra sem gutu fyrir tímann,

— dauðadagur í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— gera skal grein fyrir gögnum um dýr sem lifa ekki fram að áætlaðri aflífun en ekki skal taka þau gögn með í tölfræðilegum samanburði milli hópanna,

— hvaða dag einstakra, óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— líkamsþyngd, breyting á líkamsþyngd og þyngd legs úr dýrum með fangi, þ.m.t. (valfrjálst) breyting á líkamsþyngd með leiðréttingu fyrir þyngd legs úr dýrum með fangi,

— fóðurát sem og vatnsdrykkja, ef hún er mæld,

— niðurstöður krufningar, þ.m.t. þyngd legs,

— greina skal frá gildum fyrir mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL) á mæður og þroskun.

Endapunktar þroskunar, miðað við skammtastærðir, fyrir hvert got þar sem hreiðrun hefur átt sér stað, þ.m.t.:

— fjöldi gulbúa,

— fjöldi hreiðrana, fjöldi og hundraðshlutfall lifandi og dauðra fóstra og tilvika þar sem fósturvisnun hefur átt sér stað,

— fjöldi og hundraðshlutfall fangláta fyrir og eftir hreiðrun.

Endapunktar þroskunar, miðað við skammtastærðir, fyrir hvert got með lifandi fóstrum, þ.m.t.:

— fjöldi og hundraðshlutfall lifandi afkvæma,

— kynjahlutfall,

— líkamsþyngd fóstra, helst fyrir hvort kyn sem og bæði kynin saman,

— vansköpun (ytri, í mjúkvef og beinagrind) og aðrar breytingar sem skipta máli,

— viðmiðanir við flokkun, ef við á,

— heildarfjöldi og hundraðshlutfall fóstra og gota með breytingum (ytri, í mjúkvef eða beinagrind), svo og tegundir og tíðni einstaklingsbundinna frábrigða og annarra breytinga sem skipta máli.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Kavlock R.J. et al., (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. Risk Analysis 16; bls. 399-410.

2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z., (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. Fundamental and Applied Toxicology 14; bls. 386-398.

3) Wong, B.A., et al., (1997) Developing Specialised Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. CIIT Activities 17; bls. 1-8.

4) US Environmental Protection Agency, (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

5) Salewski, E., (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie, 247, 367.

6) Edwards, J.A., (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In Advances in Teratology. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. Congenital Anomalies 16, bls. 171-173.

8) Igarashi, E. et al., (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. Congenital Anomalies 32, bls. 381-391.

9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. Teratology, 47 bls.229-242.

10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. Teratology 37; 476.

11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. Journal of Morphology, 127, bls. 291-306.

12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. Teratology, 11 bls. 313-320.

13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. Toxicology and Applied Pharmacology, 9, bls. 398-408.

14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? Teratology, 8, bls. 309-316.

15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. Teratology, 46, bls. 169-181.

16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to Teratology Workshop Manual, bls. 163-173.

17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. American Journal of Anatomy, 41, bls. 411-445.

18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. Stain Technology, 39, bls. 61-63.

19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. American Journal of Anatomy, 36, bls. 313-355.

20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 4, bls. 181-188.

21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) The Genesis of the Rat Skeleton. Thomas, Springfield, IL.

22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In Teratology: Principles and Techniques, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, bls. 251-277.

23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) Handbook of Teratology, Vol. 4. Plenum, NY.

24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. Acta Vet. Acad. Sci. Hung, 28, bls. 233-239.

25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. Teratology, 9, bls. 37-38.

26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: Methods in Prenatal Toxicology Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, bls. 126-144.

27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register, 56, bls. 63798-63826.

28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology, 55, bls. 249-292.

B.32. **PRÓFUN Á KRABBAMEINSVALDANDI EIGINLEIKUM**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er venjulega gefið nokkrum hópum tilraunadýra sjö daga í viku eftir viðeigandi ákomuleið og í tiltekinni skammtastærð fyrir hvern hóp megnið af líftíma dýranna. Meðan á váhrifum frá prófunarefninu stendur og eftir það eru tilraunadýrin athuguð daglega með tilliti til merkja um eiturhrif, einkum æxlismyndun.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa.

1.6.1. Tilraunadýr

Nota má nota aðrar tegundir (nagdýr eða önnur dýr) ef niðurstöður úr fyrri rannsóknum styðja það. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum og hefja skammtagjöf eins fljótt og auðið er eftir fráfærur.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalgildinu. Ef rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum um munn er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sömu tegund/kyni og stofni í báðum rannsóknunum.

1.6.2. Fjöldi og kyn

Ef tilraunadýrið er nagdýr skal nota minnst 100 dýr (50 kvendýr og 50 karldýr) fyrir hverja skammtastærð og samskeiða samanburðarhóp. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar.

1.6.3. Skammtastærðir og tíðni váhrifa

Nota skal minnst þrjár skammtastærðir auk samskeiða samanburðarhóps. Stærsti skammturinn ætti að kalla fram merki um lágmarkseiturhrif, s.s. sem lítið eitt minni þyngdaraukningu (minna en 10%), án þess að breyta að ráði eðlilegum líftíma vegna annars en æxla.

Minnsti skammturinn ætti ekki að hafa áhrif á eðlilegan vöxt, þroskun og langlífi dýrsins eða kalla fram einhver merki um eiturhrif. Að jafnaði skal hann ekki vera minni en 10% af stærsta skammtinum.

Stærð milliskammts (-skammta) á að vera mitt á milli stærstu og minnstu skammtanna.

Við val á skammtastærðum skal taka tillit til gagna úr fyrri eiturhrifaprófunum og -rannsóknum.

Venjulega eru dýrin látin verða fyrir váhrifum daglega.

Ef íðefnið er gefið í drykkjarvatni eða blandað í fóður skulu dýrin ávallt hafa aðgang að vatninu eða fóðrinu.

1.6.4. Samanburðarhópar

Nota skal samskeiða samanburðarhóp sem er ekki látinn verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu en er að öðru leyti alveg eins og meðferðarhóparnir.

Við sérstakar aðstæður, s.s. í innöndunarrannsóknum með úðum eða þegar notað erýruefni með óskilgreindri, lífvirkni í rannsóknum með inngjöf um munn, skal nota samanburðarhóp til viðbótar sem er ekki látinn verða fyrir váhrifum frá burðarefninu.

1.6.5. Íkomuleið

Þrjár helstu íkomuleiðirnar eru um munn, um húð og við innöndun. Val á íkomuleið fer eftir eðlis- og efnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins og líklegri váhrifaleið hjá mönnum.

1.6.5.1. *Rannsóknir með inngjöf um munn*

Ef prófunarefnið frásogast frá meltingarvegi og ef menn geta orðið fyrir váhrifum af því við inntöku um munn er ákjósanlegasta íkomuleiðin inngjöf um munn nema vitað sé um frábendingar. Dýrunum er gefið prófunarefnið með fóðri, uppleyst í drykkjarvatni eða í hylkjum.

Best er dagleg skömmtun sjö daga í viku vegna þess að skömmtun fimm daga í viku getur orðið til þess að dýrin nái sér aftur eða fái fráhvarfseinkenni milli váhrifatímabilanna sem hefur áhrif á niðurstöðuna og mat á henni. Af hagkvæmnisástæðum fyrst og fremst er skömmtun fimm daga í viku þó talin ásættanleg.

1.6.5.2. *Húðrannsóknir*

Nota má váhrif um húð með húðpenslun til að líkja eftir einni helstu váhrifaleiðinni hjá mönnum og einnig sem tilraunalíkan til að kalla fram vefjaskemmdir í húð.

1.6.5.3. *Innöndunarrannsóknir*

Þar eð innöndunarrannsóknir hafa í för með sér flóknari tæknivandamál en rannsóknir með öðrum íkomuleiðum eru hér gefnar ítarlegri leiðbeiningar um þessa aðferð við gjöf. Athygli er vakin á því að ídreyping í barka getur verið fullnægjandi valkostur við tilteknar aðstæður.

Langtímaváhrif eru að jafnaði annaðhvort skipulögð í samræmi við áætluð váhrif á menn, og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í sex klukkustundir á dag, eftir að styrkurinn í klefanum hefur náð jafnvægi, fimm daga í viku (ósamfelld váhrif), eða skipulögð með tilliti til hugsanlegra váhrifa úr umhverfinu og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í 22–24 klukkustundir á dag, sjö daga í viku (samfelld váhrif), með u.þ.b. klukkustund daglega á svipuðum tíma til að fóðra dýrin og hreinsa klefana. Í báðum tilvikum eru dýrin að jafnaði látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í föstum styrkleikum. Meginmunurinn á ósamfelldum og samfelldum váhrifum er að í fyrra tilvikinu fá dýrin 17–18 klukkustunda tímabil án váhrifa, þar sem þau geta náð sér eftir áhrifin af váhrifum dagsins, og jafnvel lengra batatímabil um helgar.

Valið milli ósamfelldra eða samfelldra váhrifa er háð markmiðum rannsóknarinnar og þeim váhrifum á menn sem líkja á eftir. Hinsvegar þarf að hafa í huga tiltekna tæknilega örðugleika. Til dæmis getur nauðsyn þess að brynna dýrunum og fóðra þau á váhrifatímanum, sem og þörfin fyrir flóknari (og áreiðanlegri) tækni við myndun og vöktun úða og gufu, vegið upp á móti kostum þess að nota samfelld váhrif til að líkja eftir umhverfisaðstæðum.

1.6.6. Váhrifaklefar

Dýrin skulu prófuð í innöndunarklefum sem eru hannaðir til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Samanburðar- og váhrifaklefar skulu vera eins byggðir og hannaðir til að tryggja að váhrifaaðstæður séu að öllu leyti sambærilegar nema að því er varðar váhrifin frá prófunarefninu. Venjulega er vægum undirþrýstingi haldið í klefanum til að koma í veg fyrir að prófunarefnið leki út í aðliggjandi svæði. Klefinn skal hannaður þannig að ekki verði of þröngt um tilraunadýrin. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli klefans.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

i. Loftstreymi: helst skal stöðugt vakta hraða loftstreymis gegnum klefann.

ii. Styrkur: á daglega váhrifatímabilinu má styrkur prófunarefnisins ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu. Halda skal styrkleikum eins stöðugum og unnt er frá degi til dags alla rannsóknina.

iii. Hiti og raki: fyrir nagdýr ber að halda hitastigi við 22 ± 2 °C og raka í klefanum við 30–70% nema þegar vatn er notað til að dreifa prófunarefninu í andrúmslofti klefans. Helst skal stöðugt vakta bæði hita og raka.

iv. Mælingar á agnastærð: ákvarða skal stærðardreifingu agna í andrúmslofti klefa þar sem fljótandi eða föst úðaefni eru notuð. Stærð úðaagnanna skal vera slík að tilraunadýrin, sem eru notuð, geti andað þeim inn. Sýni af andrúmslofti klefans skulu tekin á öndunarsvæði dýranna. Loftsýnin skulu vera dæmigerð fyrir dreifingu agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, og með fellingarmælingum skal vera unnt að lýsa öllu svifúðaefninu á grundvelli þessara sýna, jafnvel þegar mikið af úðaefninu er ekki innöndunarhæft. Gera skal tíðar greiningar á agnastærð meðan verið er að þróa úðunarkerfið, til að tryggja stöðugleika úðans, og síðan eins oft og nauðsynlegt er meðan á váhrifum stendur til að greina með fullnægjandi hætti hvort dreifing agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, er jöfn.

1.6.7. Lengd rannsóknartíma

Prófun á krabbameinsvaldandi áhrifum nær yfir megnið af eðlilegum líftíma tilraunadýranna. Ef notaðar eru mýs og hamstrar skal ljúka prófuninni eftir 18 mánuði og eftir 24 mánuði ef rottur eru notaðar en ef notaðir eru tilteknir stofnar langlífari dýra og/eða stofnar með lága tíðni sjálfsprottinna æxla skal ljúka prófun með músum og hömstrum eftir 24 mánuði og prófun með rottum eftir 30 mánuði. Einnig má ljúka svona langri rannsókn þegar fjöldi eftirlifandi dýra í hópnum, sem fær minnsta skammtinn, eða í samanburðarhópnum er kominn niður í 25%. Við lok prófunar, þar sem sýnilegur munur er á svörun milli kynja, skal athuga hvort kynið fyrir sig. Verði ótímabær dauðsföll einungis í hópnum sem fær stærsta skammtinn og augljóslega er um eiturhrif að ræða er ekki nauðsynlegt að hætta prófuninni, að því tilskildu að eitrunaráhrif valdi ekki vandkvæðum í hinum hópunum. Til þess að neikvæð niðurstaða úr prófun teljist viðunandi mega ekki hafa tapast meira en 10% úr neinum hópi í tilrauninni vegna sjálfsrofs, sjálfsafráns eða skipulagslegra vandamála og lifunarhlutfall í öllum hópunum má ekki vera undir 50% eftir 18 mánuði, ef notaðar eru mýs og hamstrar, og eftir 24 mánuði ef rottur eru notaðar.

1.6.8. *Verkferli*

1.6.8.1. Athuganir

Daglegar athuganir á dýrunum í búrunum skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs.

Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í rannsókninni til að tryggja að þeim fækki sem minnst vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Dauðvona dýr skal fjarlægja og aflífa og kryfja þegar eftir þeim er tekið.

Skrá skal klínísk einkenni og afföll fyrir öll dýrin. Gefa skal sérstakan gaum að æxlismyndun: skrá skal hvenær hún hefst og staðsetningu, stærðarmál, útlit og þróun allra vel sýnilegra eða áþreifanlegra æxla.

Mæla skal fóðurát (og vatnsdrykkju ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) vikulega fyrstu 13 vikur rannsóknarinnar og síðan á u.þ.b. þriggja mánaða fresti nema breytingar á heilbrigðisástandi eða

líkamsþyngd gefi tilefni til annars.

Skrá skal líkamsþyngd hvers dýrs einu sinni í viku fyrstu 13 vikur prófunartímans og a.m.k. einu sinni á fjögurra vikna fresti eftir það.

1.6.8.2. *Klínískar rannsóknir*

Blóðfræði

Ef athuganir á dýrunum í búrunum benda til versnandi heilsu þeirra meðan á rannsókninni stendur skal gera deilitalningu í blóðsýnum úr viðkomandi dýrum.

Tekið er blóðstrok úr dýrunum eftir 12 mánuði, 18 mánuði og fyrir aflífun. Gera skal deilitalningu í blóðsýnum úr dýrunum í hópnum sem fær stærsta skammtinn og í samanburðarhópunum. Ef þessi gögn, einkum þau sem fást fyrir aflífun eða gögnin úr meinafræðilegu rannsókninni, benda til þess að þörf sé á því skal einnig gera deilitalningu í blóðsýnum hjá hópnum eða hópunum sem fá næststærsta skammtinn.

Stórsæ krufning

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrunum, þ.m.t. þeim sem drepast meðan á tilrauninni stendur eða finnast dauðvona og eru því aflífuð. Varðveita skal öll auðsýnileg æxli eða vefjaskemmdir eða vefjabreytingar sem grunur leikur á að séu æxli.

Eftirfarandi líffæri og vefir skulu varðveitt í hentugum miðli til að gera megi frekari vefjameinafræðilegar rannsóknir síðar: heili (þ.m.t. sneiðar af mænukylfu/heilabrú, hnykilberki og heilaberki), heiladingull, skjaldkirtill/kalkkirtill, allur hóstarkirtilsvefur, barki og lungu, hjarta, ósæð, munnvatnskirtlar, lifur, milta, nýru, nýrnahettur, bris, kynkirtlar, leg, aukalíffæri kynkerfis, húð, vélinda, magi, skeifugörn, ásgörn, dausgörn, botnristill, digurgirni, endaþarmur, þvagblaðra, dæmigerður eitill, mjólkurkirtill kvendýrs, lærisvöðvakerfi, úttaug, bringubein með beinmergi, lærleggur (þ.m.t. liðamót), mæna í þremur hæðarflötum (háls-, brjóst- og lendarhluti) og augu.

Besta leiðin til að varðveita lungu og þvagblöðru er að fylla þessa vefi með festiefni; í innöndunarrannsóknum er fylling lungnanna forsenda þess að unnt sé að gera viðeigandi vefjameinafræðilega rannsókn. Í innöndunarrannsóknum skal varðveita allan öndunarveginn, þ.m.t. nef, kok og barkakýli.

Vefjameinafræði

a) Framkvæma skal gagngera, vefjameinafræðilega rannsókn á líffærum og vefjum allra dýra sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófuninni stendur og öllum dýrum í samanburðarhópi og hópnum sem fær stærsta skammtinn.

b) Gera skal smásjárrannsókn hjá öllum hópum á öllum auðsýnilegum æxlum eða vefjaskemmdum sem grunur leikur á að séu æxli.

c) Ef markverður munur er á tíðni æxlismeina hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn og samanburðarhópnum skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á viðkomandi líffæri eða vef hjá hinum hópunum.

d) Ef lifunarhlutfall hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn er umtalsvert lægra en hjá samanburðarhópnum skal framkvæma gagngera rannsókn á hópnum sem fær næststærsta skammtinn.

e) Ef vísbendingar eru hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn um vakningu eiturhrifa eða annarra áhrifa sem gætu haft áhrif á æxlissvörun skal framkvæma gagngera rannsókn á hópnum sem fær næststærsta skammtinn.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra með æxli sem greinast meðan á prófuninni stendur, hvenær þau greinast og fjöldi dýra sem í ljós kemur við aflífun að eru með æxli. Meta skal niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður og fóður,

— prófunarskilyrði:

3.1.1. Lýsing á váhrifabúnaði:

þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til að framleiða agnir og úða, aðferð við loftstýringu, meðhöndlun á útblásturslofti og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa, ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og, eftir því sem við á, stöðugleika úðastyrkleika eða agnastærð.

3.1.2. Váhrifagögn:

Þessi gögn skulu sett í töflu, þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli loftsins),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) miðgildi agnastærðar (eftir því sem við á),

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað) og styrkleikar,

— gögn um tíðni æxla eftir kyni, skammti og tegund æxlis,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— upplýsingar um fóður og líkamsþyngd,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna ásamt lýsingu á aðferðunum sem notaðar eru,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.33. SAMEINUÐ RANNSÓKN Á LANGVINNUM EITURHRIFUM OG KRABBAMEINSVALDANDI EIGINLEIKUM

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Tilgangurinn með sameinaðri rannsókn á langvinnum eiturhrifum og krabbameinsvaldandi eiginleikum er að ákvarða langvinn og krabbameinsvaldandi áhrif efnis á spendýr eftir langvarandi váhrif.

Í þessu skyni er rannsóknin á krabbameinsvaldandi eiginleikum aukin með minnst einum meðferðarfylgihópi og einum samanburðarfylgihópi. Skammturinn, sem notaður er fyrir fylgihópinn sem fær stærsta skammtinn, má vera stærri en sá sem notaður er fyrir hópinn sem fær stærsta skammtinn í prófuninni á krabbameinsvaldandi eiginleikum. Dýrin í rannsókninni á krabbameinsvaldandi eiginleikum eru skoðuð með tilliti til almennra eiturhrifa og einnig krabbameinssvörunar. Dýrin í meðferðarfylgihópnum eru skoðuð með tilliti til almennra eiturhrifa.

Prófunarefnið er venjulega gefið nokkrum hópum tilraunadýra sjö daga í viku eftir viðeigandi íkomuleið og í tiltekinni skammtastærð fyrir hvern hóp megnið af líftíma dýranna. Meðan á váhrifum frá prófunarefninu stendur og eftir það eru tilraunadýrin athuguð daglega með tilliti til merkja um eiturhrif og æxlismyndun.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Fyrir prófun eru heilbrigð, ung dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa.

1.6.1. Tilraunadýr

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin. Heimilt er að nota aðrar tegundir (nagdýr eða önnur dýr) ef niðurstöður úr fyrri prófunum styðja það. Nota skal ung, heilbrigð dýr af algengum rannsóknarstofustofnum og hefja skammtagjöf eins fljótt og auðið er eftir fráfærur.

Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalgildinu. Ef rannsókn á hálflangvinnum eiturhrifum við inngjöf um munn er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sömu tegund og kyni/stofni í báðum rannsóknunum.

1.6.2. Fjöldi og kyn

Ef tilraunadýrið er nagdýr skal nota minnst 100 dýr (50 kvendýr og 50 karldýr) fyrir hverja skammtastærð og samskeiða samanburðarhóp. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Ef áform eru um að aflífa dýr í rannsókninni skal fjölga tilraunadýrum sem nemur þeim fjölda dýra sem ætlunin er að aflífa fyrir lok rannsóknarinnar.

Í meðferðarfylgihópnum (-hópunum), þar sem fram fer annað meinafræðilegt mat en á æxlum, skulu vera 20 dýr af hvoru kyni en í samanburðarfylgihópnum skulu vera 10 dýr af hvoru kyni.

1.6.3. Skammtastærðir og tíðni váhrifa

Við prófun á krabbameinsvaldandi eiginleikum skal nota minnst þrjár skammtastærðir auk samskeiða samanburðarhóps. Stærsti skammturinn ætti að kalla fram merki um lágmarkseiturhrif, s.s. lítið eitt minni þyngdaraukningu (minni en 10%), án þess að breyta að ráði eðlilegum líftíma vegna annars en æxla.

Minnsti skammturinn ætti ekki að hafa áhrif á eðlilegan vöxt, þroskun og langlífi dýrsins eða kalla fram einhver merki um eiturhrif. Að jafnaði skal hann ekki vera minni en 10% af stærsta skammtinum.

Stærð milliskammts (-skammta) á að vera mitt á milli stærstu og minnstu skammtanna.

Við val á skammtastærðum skal taka tillit til gagna úr fyrri eiturhrifaprófunum og -rannsóknum.

Við prófanir á langvinnum eiturhrifum eru fleiri meðferðarhópar og samskeiða samanburðarfylgihópur hafðir með í rannsókninni. Stærsti skammtur, sem dýrin í fylgihópnum eða -hópunum er gefinn, ætti að kalla fram greinileg merki um eiturhrif.

Venjulega eru dýrin látin verða fyrir váhrifum daglega.

Ef íðefnið er gefið í drykkjarvatni eða blandað í fóður skulu dýrin ávallt hafa aðgang að vatninu eða fóðrinu.

1.6.4. Samanburðarhópar

Nota skal samskeiða hóp sem er ekki látinn verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu en er að öðru leyti alveg eins og meðferðarhóparnir.

Við sérstakar aðstæður, s.s. í innöndunarrannsóknum með úðaefnum eða þegar notað erýruefni með óskilgreindri, lífvirkni í rannsóknum með inngjöf um munn, skal nota samanburðarhóp til viðbótar sem er ekki látinn verða fyrir váhrifum frá burðarefninu.

1.6.5. Íkomuleið

Þrjár helstu íkomuleiðirnar eru um munn, um húð og við innöndun. Val á íkomuleið fer eftir eðlis- og efnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins og líklegri váhrifaleið hjá mönnum.

1.6.5.1. *Prófanir með inngjöf um munn*

Ef prófunarefnið frásogast frá meltingarvegi og menn geta orðið fyrir váhrifum af því um munn er ákjósanlegasta íkomuleiðin inngjöf um munn nema vitað sé um frábendingar. Dýrunum er gefið prófunarefnið með fóðri, uppleyst í drykkjarvatni eða í hylkjum.

Best er dagleg skömmtun sjö daga í viku vegna þess að skömmtun fimm daga í viku getur orðið til þess að dýrin nái sér aftur eða fái fráhvarfseinkenni milli váhrifatímabilanna sem hefur áhrif á niðurstöðuna og mat á henni. Af hagkvæmnisástæðum fyrst og fremst er skömmtun fimm daga í viku þó talin ásættanleg.

1.6.5.2. *Húðprófanir*

Nota má váhrif um húð með húðpenslun til að líkja eftir einni helstu váhrifaleiðinni hjá mönnum og einnig sem tilraunalíkan til að kalla fram vefjaskemmdir í húð.

1.6.5.3. *Innöndunarprófanir*

Þar eð innöndunarprófanir hafa í för með sér flóknari tæknivandamál en aðrar íkomuleiðir eru gefnar hér ítarlegri leiðbeiningar um þessa aðferð við gjöf. Athygli er vakin á því að ídreyping í barka getur verið fullnægjandi valkostur við tilteknar aðstæður.

Langtímaváhrif eru að jafnaði annaðhvort skipulögð í samræmi við áætluð váhrif á menn, og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í sex klukkustundir á dag, eftir að styrkurinn í klefanum hefur náð jafnvægi, fimm daga í viku (ósamfelld váhrif), eða skipulögð með tilliti til hugsanlegra váhrifa úr umhverfinu og eru dýrin þá látin verða fyrir váhrifum í 22–24 klukkustundir á dag, sjö daga í viku (samfelld váhrif), með u.þ.b. klukkustund daglega á svipuðum tíma til að fóðra dýrin og hreinsa klefana. Í báðum tilvikum eru dýrin að jafnaði látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu í föstum styrkleikum. Meginmunurinn á ósamfelldum og samfelldum váhrifum er að í fyrra tilvikinu fá dýrin 17–18 klukkustunda tímabil án váhrifa, þar sem þau geta náð sér eftir áhrifin af váhrifum dagsins, og jafnvel lengra batatímabil um helgar.

Valið milli ósamfelldra eða samfelldra váhrifa er háð markmiðum rannsóknarinnar og þeim váhrifum á menn sem líkja á eftir. Hinsvegar þarf að hafa í huga tiltekna tæknilega örðugleika. Til dæmis getur nauðsyn þess að brynna dýrunum og fóðra þau á váhrifatímanum, sem og þörfin fyrir flóknari (og áreiðanlegri) tækni við myndun og vöktun úða og gufu, vegið upp á móti kostum þess að nota samfelld váhrif til að líkja eftir umhverfisaðstæðum.

1.6.6. Váhrifaklefar

Dýrin skulu prófuð í innöndunarklefum sem eru hannaðir til að viðhalda virku loftstreymi, sem nemur a.m.k. 12 loftskiptum á klukkustund, til að tryggja nægilegt súrefnismagn og jafna dreifingu váhrifaloftsins. Samanburðar- og váhrifaklefar skulu vera eins byggðir og hannaðir til að tryggja að váhrifaaðstæður séu að öllu leyti sambærilegar nema að því er varðar váhrifin frá prófunarefninu. Venjulega er vægum undirþrýstingi haldið í klefanum til að koma í veg fyrir að prófunarefnið leki út í aðliggjandi svæði. Klefinn skal hannaður þannig að ekki verði of þröngt um tilraunadýrin. Ef tryggja á stöðugleika andrúmsloftsins í klefanum er almenna reglan sú að heildarumfang tilraunadýranna má ekki vera meira en 5% af rúmmáli klefans.

Mælingar og vöktun skulu vera sem hér segir:

i. Loftstreymi: helst skal stöðugt vakta hraða loftstreymis gegnum klefann.

ii. Styrkur: á daglega váhrifatímabilinu má styrkurinn ekki víkja meira en ± 15% frá meðalgildinu. Halda skal styrkleikum eins stöðugum og unnt er frá degi til dags alla rannsóknina.

iii. Hiti og raki: fyrir nagdýr ber að halda hitastigi við 22 ± 2 °C og raka í klefanum við 30–70% nema þegar vatn er notað til að dreifa prófunarefninu í andrúmslofti klefans. Helst skal stöðugt vakta bæði hita og raka.

iv. Mælingar á agnastærð: ákvarða skal stærðardreifingu agna í andrúmslofti klefa þar sem fljótandi eða föst úðaefni eru notuð. Stærð úðaagnanna skal vera slík að tilraunadýrin, sem eru notuð, geti andað þeim inn. Sýni af andrúmslofti klefans skulu tekin á öndunarsvæði dýranna. Loftsýnin skulu vera dæmigerð fyrir dreifingu agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, og með fellingarmælingum skal vera unnt að lýsa öllu svifúðaefninu á grundvelli þessara sýna, jafnvel þegar mikið af úðaefninu er ekki innöndunarhæft. Gera skal tíðar greiningar á agnastærð meðan verið er að þróa úðunarkerfið, til að tryggja stöðugleika úðans, og síðan eins oft og nauðsynlegt er meðan á váhrifum stendur til að greina með fullnægjandi hætti hvort dreifing agnanna, sem dýrin eru látin verða fyrir váhrifum frá, er jöfn.

1.6.7. Lengd prófunartíma.

Sá hluti prófunarinnar, sem tekur til krabbameinsvaldandi eiginleika, nær yfir megnið af eðlilegum líftíma tilraunadýranna. Ef notaðar eru mýs og hamstrar skal ljúka prófuninni eftir 18 mánuði og eftir 24 mánuði ef rottur eru notaðar en ef notaðir eru tilteknir stofnar langlífari dýra og/eða stofnar með lága tíðni sjálfsprottinna æxla skal ljúka prófun með músum og hömstrum eftir 24 mánuði og prófun með rottum eftir 30 mánuði. Einnig má ljúka svona langri rannsókn þegar fjöldi eftirlifandi dýra í hópnum, sem fær minnsta skammtinn, eða samanburðarhópnum er kominn niður í 25%. Við lok prófunar, þar sem sýnilegur munur er á svörun milli kynja, skal athuga hvort kynið fyrir sig. Verði ótímabær dauðsföll einungis í hópnum sem fær stærsta skammtinn og augljóslega er um eiturhrif að ræða er ekki nauðsynlegt að hætta prófuninni, að því tilskildu að eitrunaráhrif valdi ekki vandkvæðum í hinum hópunum. Til þess að neikvæð niðurstaða úr prófun teljist viðunandi mega ekki hafa tapast meira en 10% úr neinum hópi í tilrauninni vegna sjálfsrofs, sjálfsafráns eða skipulagslegra vandamála og lifunarhlutfall í öllum hópunum má ekki

vera undir 50% eftir 18 mánuði, ef notaðar eru mýs og hamstrar, og eftir 24 mánuði ef rottur eru notaðar.

Fylgihópum með 20 dýrum af hvoru kyni sem fá meðferð og tilheyrandi 10 samanburðardýr af hvoru kyni, sem notuð eru við prófun á langvinnum eiturhrifum, skal haldið í prófuninni í a.m.k. 12 mánuði. Þessi dýr skulu aflífuð samkvæmt tímaáætlun sem miðast við að unnt sé að gera meinafræðilega rannsókn á áhrifum prófunarefnisins án þess að breytingar vegna öldrunar hafi truflandi áhrif á niðurstöðurnar.

1.6.8. *Verkferli*

1.6.8.1. Athuganir

Gera skal daglegar athuganir á dýrunum í búrunum sem skulu ná til breytinga í húð og feldi, augum og slímhúð og auk þess til öndunarfæra, blóðrásar, ósjálfráða taugakerfisins og miðtaugakerfisins, hreyfinga og atferlismynsturs.

Klíníska rannsóknir skal gera með hæfilegu millibili á dýrum í meðferðarfylgihópnum eða -hópunum.

Nauðsynlegt er að fylgjast reglulega með dýrunum í prófuninni til að tryggja að þeim fækki sem minnst vegna sjálfsafráns, vegna sjálfsrofs vefja eða vegna þess að þau misfarast. Dauðvona dýr skal fjarlægja og aflífa og kryfja þegar eftir þeim er tekið.

Skrá skal klínísk einkenni fyrir öll dýrin, þ.m.t. taugafræðilegar breytingar og breytingar í augum, sem og dánahlutfall. Gefa skal sérstakan gaum að æxlismyndun: skrá skal hvenær hún hefst og staðsetningu, stærðarmál, útlit og þróun allra vel sýnilegra eða áþreifanlegra æxla; skrá skal upphafstíma og þróun eitrunareinkenna.

Mæla skal fóðurát (og vatnsdrykkju ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) vikulega fyrstu 13 vikur rannsóknarinnar og síðan á u.þ.b. þriggja mánaða fresti nema breytingar á heilbrigðisástandi eða líkamsþyngd gefi tilefni til annars.

Skrá skal líkamsþyngd hvers dýrs einu sinni í viku fyrstu 13 vikur prófunartímans og a.m.k. einu sinni á fjögurra vikna fresti eftir það.

1.6.8.2. *Klíníska rannsóknir*

Blóðfræði

Gera skal blóðrannsókn (t.d. varðandi blóðrauðainnihald, blóðkornaskil, heildarfjölda rauðkorna, heildarfjölda hvítkorna, blóðflögur eða aðrar mælingar á storknunarhæfni), eftir þrjá mánuði og sex mánuði og síðan á u.þ.b. sex mánaða fresti og í lok rannsóknarinnar, á blóðsýnum sem safnað er frá 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópum. Ef unnt er skulu sýnin tekin úr sömu rottunum í hvert skipti.

Ef athuganir á dýrunum í búrunum benda til versnandi heilsu þeirra meðan á rannsókninni stendur skal gera deilitalningu á blóðsýnum úr viðkomandi dýrum. Gera skal deilitalningu í blóðsýnum úr dýrunum í hópnum sem fær stærsta skammtinn og í samanburðarhópunum. Deilitalningar í blóðsýnum eru einungis gerðar fyrir hópinn eða hópana sem fá næststærsta skammtinn ef mikið ósamræmi er milli hópsins sem fær stærsta skammtinn og samanburðarhópanna eða ef meinafræðilegar niðurstöður gefa tilefni til þess.

Þvagrannsóknir

Safna skal þvagsýnum til greiningar úr 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópunum, ef unnt er úr sömu rottunum og í blóðrannsókninni og með sama millibili og sýni eru tekin þar. Gera skal greiningar, annaðhvort á sýni úr hverju dýri um sig eða, þegar um nagdýr er að ræða, á safnsýni úr hvoru kyni í hverjum hópi, varðandi eftirfarandi:

— útlit, rúmmál og þéttleika fyrir hvert dýr,

— prótín, glúkósa, ketón og blóðmigu (hálfmegindlega),

— botnfall, með smásjárrannsókn (hálfmegindlega),

Klínísk efnafræði

Blóðsýni fyrir klíníska, efnafræðilegar mælingar eru tekin á u.þ.b. sex mánaða fresti og í lok rannsóknarinnar úr öllum dýrum sem eru ekki nagdýr og úr 10 rottum af hvoru kyni í öllum hópunum, helst úr sömu rottunum hverju sinni. Að auki skal taka forprófunarsýni úr öðrum dýrum en nagdýrum. Blóðvökvi er útbúinn úr þessum sýnum og gerðar greiningar varðandi eftirfarandi:

— heildarprótínstyrk,

— albúmínstyrk,

— prófanir á lifrarstarfsemi (s.s. virkni basískra fosfatasa, glútamínpýruvíntransamínasa ([1]) og glútamínoxalóasetattransamínasa ([2]), gammaglútamýltranspeptíðasa og ornitíndekarboxýlasa),

— kolvetnaefnaskipti, s.s. glúkósa í blóði eftir föstu,

— prófanir á virkni nýrna, s.s. köfnunarefni úr þvagefni í blóði.

Stórsæ krufning

Framkvæma skal gagngera, stórsæja krufningu á öllum dýrunum, þ.m.t. þeim sem drepast meðan á tilrauninni stendur eða finnast dauðvona og eru því aflífuð. Fyrir aflífun skal taka blóðsýni úr öllum dýrum til deilitalningar. Varðveita skal öll auðsýnileg æxli eða vefjaskemmdir sem grunur er um að séu æxli. Leitast skal við að tengja stórsæjar athuganir við niðurstöður smásjárrannsókna.

Varðveita skal öll líffæri og vefi fyrir vefjameinafræðilega rannsókn. Þetta á yfirleitt við um eftirfarandi líffæri og vefi: heila ([3]) (mænukylfu/heilabrú, hnykilbörk, heilabörk), heiladingul, skjaldkirtil (þ.m.t. kalkkirtil), hóstarkirtil, lungu (þ.m.t. barka), hjarta, ósæð, munnvatnskirtla, lifur ([3]), milta, nýru ([3]), nýrnahettur ([3]), vélinda, maga, skeifugörn, ásgörn, dausgörn, botnristil, ristil, endaþarm, þvagblöðru, eitla, bris, kynkirtla ([3]), aukalíffæri kynkerfis, mjólkurkirtla kvendýra, húð, vöðvakerfi, úttaug, mænu (háls-, brjóst- og lendahluta), bringubein með beinmergi, lærlegg (þ.m.t. liðamót) og augu.

Þótt besta leiðin til að varðveita lungu og þvagblöðru sé að fylla þessa vefi með festiefni er fylling lungnanna í innöndunarrannsóknum forsenda þess að unnt sé að gera viðeigandi vefjameinafræðilega rannsókn. Í sérstökum rannsóknum á borð við innöndunarrannsóknir skal rannsaka allan öndunarveginn, þ.m.t. nef, kok og barkakýli.

Ef aðrar klínískar rannsóknir fara fram eiga upplýsingar úr þeim að liggja fyrir áður en smásjárrannsókn er gerð þar eð þær geta gefið meinafræðingnum mikilvægar leiðbeiningar.

Vefjameinafræði

Prófunarhlutinn fyrir langvinn eiturhrif:

Skoða skal ítarlega öll líffæri sem varðveitt eru úr dýrunum í fylgihópnum sem fær stærsta skammtinn og samanburðarhópnum. Finnist prófunarefnistengd, meinafræðileg merki hjá fylgihópnum sem fær stærsta skammtinn skal í lok rannsóknarinnar fara fram gagnger, vefjafræðileg rannsókn á marklíffærum allra annarra dýra í öllum öðrum meðferðarfylgihópum, sem og í meðferðarhópunum í prófunarhluta rannsóknarinnar fyrir krabbameinsvaldandi eiginleika.

Prófunarhlutinn fyrir krabbameinsvaldandi eiginleika:

a) Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á líffærum og vefjum allra dýra sem drepast eða eru aflífuð meðan á prófuninni stendur og á öllum dýrum í samanburðarhópnum og hópnum sem fær stærsta skammtinn.

([1]) Núna þekktur sem alanínamínótransferasi í sermi.

([2]) Núna þekktur sem aspartatamínótransferasi í sermi.

([3]) Vigta skal þessi líffæri, sem eru tekin úr 10 dýrum af hvoru kyni í hverjum hópi, þegar um er að ræða nagdýr.

b) Öll sýnileg æxli, eða vefjaskemmdir, sem grunur er um að séu æxli, sem koma fram í einhverju líffæri ber að skoða í smásjá í öllum hópunum.

c) Ef markverður munur er á tíðni æxlismeina hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn og samanburðarhópnum skal gera vefjameinafræðilega rannsókn á viðkomandi líffæri eða vef hjá hinum hópunum,

d) Ef lifunarhlutfall hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn er umtalsvert lægra en hjá samanburðarhópnum skal framkvæma gagngera rannsókn á hópnum sem fær næststærsta skammtinn.

e) Ef vísbendingar eru hjá hópnum sem fær stærsta skammtinn um vakningu eiturhrifa eða annarra áhrifa sem gætu haft áhrif á æxlissvörun skal framkvæma gagngera rannsókn á hópnum sem fær næststærsta skammtinn.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra með æxli eða eiturhrif sem greinast meðan á prófuninni stendur, hvenær þau greinast og fjöldi dýra sem í ljós kemur við aflífun að eru með æxli. Meta skal niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður, fóður,

— prófunarskilyrði:

3.1.1. Lýsing á váhrifabúnaði:

þ.m.t. á hönnun, tegund, stærðarmálum, loftgjafa, kerfi til að framleiða agnir og úða, aðferð við loftstýringu, meðhöndlun á útblásturslofti og hvernig dýrunum er haldið í prófunarklefa, ef hann er notaður. Lýsa skal búnaði til að mæla hitastig, raka og, eftir því sem við á, stöðugleika úðastyrkleika eða agnastærð.

3.1.2. Váhrifagögn:

Þessi gögn skulu sett í töflu, þar sem getið er meðalgilda og mælingar á breytileika (t.d. staðalfráviks) og eftirtalin atriði skulu koma fram:

a) hraði loftstreymis gegnum innöndunarbúnaðinn,

b) hiti og raki loftsins,

c) nafnstyrkleikar (heildarmagn prófunarefnis sem sett er í innöndunarbúnaðinn, deilt með rúmmáli loftsins),

d) tegund burðarefnis, ef það er notað,

e) raunstyrkleikar á öndunarsvæðinu í prófuninni,

f) miðgildi agnastærðar (eftir því sem við á),

— skammtastærðir (þ.m.t. burðarefni, ef það er notað) og styrkleikar,

— gögn um tíðni æxla eftir kyni, skammti og tegund æxlis,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar, þ.m.t. fylgihópur,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti,

— lýsing á eiturhrifum eða öðrum áhrifum,

— hvenær einstakra óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— niðurstöður augnskoðunar,

— upplýsingar um fóður og líkamsþyngd,

— blóðprófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim,

— klínískar, lífefnafræðilegar prófanir, sem gerðar eru, og allar niðurstöður úr þeim (þ.m.t. úr þvagrannsóknum, ef þær eru gerðar),

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna ásamt lýsingu á aðferðunum sem notaðar eru,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.34. PRÓFUN Á EITURHRIFUM Á ÆXLUN HJÁ EINNI KYNSLÓÐ

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunarefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýr skulu fá skammta meðan þau eru að vaxa og í a.m.k. einn heilan sæðismyndunarhring (u.þ.b. 56 dagar hjá músum og 70 dagar hjá rottum) til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á sæðismyndun, ef einhver eru.

Kvendýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu fá skammta í a.m.k. tvo heila gangferla til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á gangmál, ef einhver eru. Dýrin eru síðan pöruð. Prófunarefnið er gefið báðum kynjum á pörunartímabilinu en eftir það aðeins kvendýrum á meðgöngu og meðan afkvæmin eru á spena. Fyrir inngjöf við innöndun þarf að breyta aðferðinni.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Undirbúningur*

Fyrir prófun eru heilbrigð, ung, fullvaxin dýr valin af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa. Dýrin eru haldin við tilraunaaðstæðurnar, að því er varðar aðbúnað og fóðrun, í minnst fimm daga fyrir prófunina. Mælt er með því að gefa prófunarefnið í fóðri eða drykkjarvatni. Einnig má nota aðrar íkomuleiðir. Öll dýrin skulu fá skammtana með sömu aðferð á viðkomandi tímabili tilraunarinnar. Ef burðarefni eða önnur íblöndunarefni eru notuð til að auðvelda skömmtun verður að vera fullvíst að þau valdi ekki eiturhrifum. Skömmtun skal fara fram sjö daga í viku.

1.6.2. Tilraunadýr

Val á dýrategund

Rottur eða mýs eru ákjósanlegustu dýrategundirnar. Nota skal heilbrigð dýr sem hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Ekki skal nota stofna með litla frjósemi. Tilgreina skal tegund, stofn, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna.

Til að fá fullnægjandi mat á frjósemi skal rannsaka bæði karldýr og kvendýr. Öll tilrauna- og samanburðardýr skulu vanin undan áður en skömmtun hefst.

Fjöldi og kyn

Í hverjum meðferðar- og samanburðarhópi skulu vera nægilega mörg dýr til að u.þ.b. 20 kvendýr með fangi séu í hverjum hópi á gottíma eða rétt fyrir gottíma.

Markmiðið er nægilega margar þunganir og afkvæmi til að marktækt mat fáist á mætti efnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu og atferli mæðra af P-kynslóðinni og á mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F_1-afkvæmanna frá getnaði fram að fráfærum.

1.6.3. Prófunarskilyrði

Dýrin skulu fá fóður og vatn að vild. Er líður að goti skal koma kvendýrum með fangi hverju fyrir sig í got- eða mæðrabúr og má láta dýrin fá efni til að gera sér bæli.

1.6.3.1. Skammtastærðir

Nota skal a.m.k. þrjá meðferðarhópa og samanburðarhóp. Ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður. Ef prófunarefni veldur því að dregur úr fóðuráti eða fóðurnýtingu getur verið nauðsynlegt að nota samanburðarhóp sem er fóðraður samhliða. Æskilegast er, svo fremi að eðlisefnafræðilegir eiginleikar eða líffræðileg áhrif prófunarefnisins setji því ekki skorður, að stærsti skammturinn valdi eiturhrifum en ekki dauða hjá dýrum af foreldrakynslóðinni (P-kynslóðinni). Milliskammturinn eða -skammtarnir ættu að valda lágmarks-eiturhrifum, sem rekja má til prófunarefnisins, og minnsti skammturinn ætti ekki að hafa nein sjáanleg, skaðleg áhrif á foreldra eða afkvæmi. Ef prófunarefnið er gefið með magaslöngu eða í hylki skal skömmtun fyrir hvert dýr miðast við líkamsþyngd þess og skal aðlöguð vikulega til samræmis við breytingar á líkamsþyngd. Hjá kvendýrum má miða skömmtun á meðgöngu við líkamsþyngd á núlldegi eða 6. degi meðgöngunnar ef æskilegt þykir.

1.6.3.2. Markprófun

Ef um er að ræða efni sem hefur lítil eiturhrif og skammtur sem er a.m.k. 1000 mg/kg framkallar engin merki um röskun á tímgunargetu kunna rannsóknir með öðrum skammtastærðum að teljast ónauðsynlegar. Ef forrannsókn með stærsta skammtinum framkallar skýr merki um eiturhrif hjá móður en hefur engin skaðleg áhrif á frjósemi kunna rannsóknir með öðrum skammtastærðum að teljast ónauðsynlegar.

1.6.3.3. Framkvæmd prófunarinnar

Tilraunaáætlanir

Hefja skal daglega skömmtun hjá karldýrum af foreldrakynslóðinni (P) þegar þau eru um fimm til níu vikna gömul og hafa verið vanin undan og látin aðlagast aðstæðum í minnst fimm daga. Hjá rottum er skammtagjöf haldið áfram í 10 vikur fyrir pörunartímabilið (átta vikur hjá músum). Karldýrin eru annaðhvort aflífuð og rannsökuð við lok pörunartímabilsins eða þeim er gefið prófunarfóðrið áfram svo að hugsanlega megi fá annað got og eru þau þá aflífuð og rannsökuð einhvern tímann fyrir lok rannsóknarinnar. Hjá kvendýrum af foreldrakynslóðinni (P) skal hefja skömmtun eftir minnst fimm daga aðlögun að umhverfisaðstæðum og halda henni áfram í minnst tvær vikur fyrir pörun. Daglegri skömmtun hjá kvendýrunum af foreldrakynslóðinni (P) er haldið áfram allt þriggja vikna pörunartímabilið, alla meðgönguna og þar til F_1-afkvæmin eru vanin undan. Rétt er að yfirvega hvort gera skuli breytingar á skömmtunaráætluninni ef tiltækar upplýsingar um prófunarefnið gefa tilefni til þess, þ.m.t. fyrirliggjandi gögn um vakningu efnaskipta eða uppsöfnun í lífverum.

Pörunaraðferð

Nota má hlutföllin 1:1 (eitt karldýr og eitt kvendýr) eða 1:2 (eitt karldýr og tvö kvendýr) við pörun í rannsóknum á eiturhrifum á æxlun.

Við 1:1 pörun er eitt kvendýr sett til sama karldýrs uns kvendýrið hefur tekið fangi eða þar til liðnar eru þrjár vikur. Á hverjum morgni er leitað að sæði eða leggangatappa í kvendýrunum. Dagurinn þegar leggangatappi eða sæði finnst telst vera núlldagur meðgöngu.

Rannsaka ber þau pör sem ekki maka sig til að greina orsök þess sem virðist vera ófrjósemi.

Þetta má t.d. gera með því að leyfa dýrunum að maka sig með öðrum karl- eða kvendýrum sem hafa reynst frjósöm, með smásjárrannsókn á æxlunarfærum dýranna og með því að kanna gangferilinn eða sæðis-myndunina.

Gotstærð

Dýrum, sem fá skammta meðan á frjósemisrannsókninni stendur, er leyft að gjóta á eðlilegan hátt og annast afkvæmin fram að fráfærum án þess að stærð gothópsins sé stöðluð.

Ef notuð er stöðlun er mælt með eftirfarandi verkferli. Á 1.–4. degi eftir got má aðlaga stærð hvers gothóps með því að velja úr og fjarlægja aukaunga til að eftir verði, eins nálægt því og mögulegt er, fjögur karldýr og fjögur kvendýr í hverjum gothópi.

Þegar fjöldi karlkyns eða kvenkyns unga gefur ekki kost á fjórum af hvoru kyni í hverjum gothópi má nota ófullkomna aðlögun (t.d. fimm karldýr og þrjú kvendýr). Ekki er hægt að aðlaga gothópa sem í eru færri en átta ungar.

1.6.4. Athuganir

Athuga skal hvert dýr minnst einu sinni á dag allt prófunartímabilið. Skrá skal breytingar á atferli sem máli skipta, merki um erfitt eða langvarandi got og öll merki um eiturhrif, að dauða meðtöldum. Fóðurát má mæla daglega á pörunar- og mökunartímabilum. Eftir got og á mjólkurskeiði skal mæla fóðurneyslu (og vatnsdrykkju ef prófunarefnið er gefið í drykkjarvatni) sama dag og gotið er vigtað. Karl- og kvendýr í P-kynslóð skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtunar og síðan vikulega. Þessar athuganir ber að skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig.

Lengd meðgöngutíma skal reiknuð frá núlldegi meðgöngu. Rannsaka skal hvern gothóp eins fljótt og hægt er að loknu goti til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra unga, fjölda lifandi unga og stórsæ frábrigði.

Dauða unga og unga sem eru aflífaðir á 4. degi skal varðveita og rannsaka með tilliti til hugsanlegra galla. Telja skal lifandi unga og vigta gotið morguninn eftir fæðingu og á 4. og 7. degi og vikulega eftir það fram að lokum rannsóknarinnar en þá skal vigta hvert dýr fyrir sig.

Líkamlegur eða atferlislegur afbrigðileiki, sem kemur í ljós hjá mæðrum eða afkvæmum, skal skráður.

1.6.5. Meinafræði

1.6.5.1. Krufning

Stórsæ skoðun skal fara fram á dýrum af P-kynslóðinni (foreldrakynslóðinni), sem eru aflífuð eða deyja á meðan á rannsókninni stendur, til að leita að frávikum í líkamsbyggingu eða sjúklegum breytingum, með sérstakri áherslu á æxlunarfærin. Dauða eða dauðvona unga skal skoða með tilliti til galla.

1.6.5.2. Vefjameinafræði

Varðveita skal eggjastokka, leg, legháls, leggöng, eistu, eistalyppur, sáðblöðrur, blöðruhálskirtil, hlaupkirtil, heiladingul og marklíffæri allra dýra af P-kynslóð til smásjárrannsókna. Hafi þessi líffæri hafa ekki verið rannsökuð í öðrum fjölskammtarannsóknum skal, ef það er gerlegt, rannsaka sömu líffæri úr öllum dýrum sem fengu stærsta skammtinn og úr samanburðardýrunum og dýrum sem deyja meðan á rannsókninni stendur.

Líffæri úr þessum dýrum, sem bera merki um afbrigðileika, ber síðan að rannsaka úr öllum öðrum dýrum í P-kynslóðinni. Í slíkum tilvikum skal framkvæma smásjárrannsókn á öllum vefjum sem bera merki um stórsæjar, sjúklegar breytingar. Eins og lagt er til undir lýsingu á pörun má gera smásjárrannsókn á æxlunarfærum dýra sem talin eru ófrjó.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphafi prófunar, fjöldi frjórra karldýra, fjöldi kvendýra með fangi, tegundir breytinga og hundraðshluti dýra með hverja tegund breytinga.

Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með viðeigandi tölfræðiaðferð. Nota má allar almennt viðurkenndar tölfræðiaðferðir.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. frjósemi, meðganga og lífvænleiki afkvæma,

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýr lifðu til aflífunar samkvæmt áætlun eða til loka rannsóknarinnar,

— tafla sem sýnir þyngd hvers gots, meðalþyngd unga og þyngd hvers unga við lok rannsóknarinnar,

— eiturhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi og vöxt eftir fæðingu,

— hvaða dag einstakra, óeðlilegra einkenna varð vart og hvernig þau þróuðust,

— gögn um líkamsþyngd dýra af P-kynslóðinni,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum niðurstöðum úr smásjárrannsóknum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.35. RANNSÓKN Á EITURHRIFUM Á ÆXLUN HJÁ TVEIMUR KYNSLÓÐUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 416 um prófanir (2001).

1.1. INNGANGUR

Þessi aðferð við æxlunarprófun á tveimur kynslóðum er hönnuð með það fyrir augum að afla almennra upplýsinga um áhrif prófunarefnis á heilleika og starfsemi æxlunarkerfa karl- og kvendýra, þ.m.t. kynkirtlastarfsemi, gangferil, mökunarhegðun, getnað, meðgöngu, got, mjólkurmyndun og fráfærur, og á vöxt og þroskun afkvæma. Rannsóknin getur einnig gefið upplýsingar um áhrif prófunarefnisins á sjúkdóms- og dánartölu hjá nýburum og bráðabirgðagögn um eiturhrif á þroskun fyrir og eftir got og auk þess verið leiðbeinandi í prófunum sem fylgja í kjölfarið. Ætlunin með þessari prófunaraðferð er að meta heilleika og starfsemi æxlunarkerfa karl- og kvendýra og einnig vöxt og þroskun F_2-kynslóðarinnar, auk þess að rannsaka vöxt og þroskun F_1-kynslóðarinnar. Hægt er að fá frekari upplýsingar um eiturhrif á þroskun og starfræna skerðingu með því að bæta rannsóknaráföngum inn í þessa aðferðarlýsingu og hafa þar til hliðsjónar aðferðir til að meta eiturhrif á þroskun og/eða taugaeiturhrif á þroskun, eftir því sem við á, eða með því að rannsaka þessa endapunkta í sérstökum rannsóknum og nota til þess viðeigandi prófunaraðferðir.

1.2. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Nokkrum hópum karl- og kvendýra er gefið prófunarefnið í stigskiptum skömmtum. Karldýrin af P-kynslóðinni fá skammta meðan þau eru að vaxa og í a.m.k. einn heilan sæðismyndunarhring (u.þ.b. 56 dagar hjá músum og 70 dagar hjá rottum) til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á sæðismyndun, ef um þau er að ræða. Áhrif á sæði eru ákvörðuð með ýmsum mæliþáttum er varða sæði (t.d. útlit og hreyfanleiki sæðisfrumna) og með skoðun vefjasýna og ítarlegum vefjameinafræðilegum athugunum. Ef til eru gögn um sæðismyndun úr eldri og nógu langvarandi rannsókn með endurteknum skömmtum, t.d. úr 90 daga rannsókn, er ekki nauðsynlegt að hafa karldýr af P-kynslóðinni með í matinu. Þó er mælt með því að sýni af sæðisfrumum P-kynslóðarinnar eða stafræn upptaka með þeim verði geymd svo að unnt verði að meta þau síðar. Kvendýr af P-kynslóðinni fá skammta meðan þau eru að vaxa og í nokkra heila gangferla til að kalla fram skaðleg áhrif prófunarefnisins á eðlileg gangmál, ef um slík áhrif er að ræða. Prófunarefnið er gefið dýrum af foreldrakynslóðinni (P) meðan á mökun og meðgöngu stendur og allan tímann meðan F_1-afkvæmi þeirra eru vanin undan. Að afstöðnum fráfærum hjá afkvæmum af F_1-kynslóð (F_1-afkvæmum) er þeim gefið efnið allt vaxtarskeiðið og pörunartímabilið og þar til fráfærur afkvæma þeirra (F_2-kynslóðarinnar) eru afstaðnar.

Gerðar eru klíníska athuganir og meinafræðilegar rannsóknir á öllum dýrum til að leita að merkjum um eiturhrif og er sérstaklega gefinn gaumur að áhrifum á heilleika og starfsemi æxlunarfæra karl- og kvendýra og á vöxt og þroskun afkvæma.

1.3. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.3.1. **Val á dýrategund**

Rottur eru ákjósanlegasta dýrategundin fyrir þessa prófun. Séu notaðar aðrar tegundir þarf að rökstyðja það og gera viðeigandi breytingar. Ekki skal nota stofna með litla frjósemi eða ef vitað er að þroskunargallar eru algengir hjá þeim. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.3.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 ºC). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð.

Dýrin má hafa hvert í sínu búri eða litla hópa af sama kyni saman í búri. Pörun skal fara fram í búrum sem til þess henta. Þegar vísbendingar eru um að mökun hafi átt sér stað skulu pöruðu kvendýrin höfð hvert í sínu got- eða mæðrabúri. Paraðar rottur má einnig hafa í litlum hópum og skilja þær í sundur einum eða tveimur dögum fyrir got. Þegar styttist í got skulu pöruðu dýrin hafa aðgang að viðeigandi og nánar skilgreindu efni til að gera sér bæli.

1.3.3. **Dýrin undirbúin**

Nota skal heilbrigð, ung dýr sem hafa verið látin venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga og hafa ekki verið notuð áður við tilraunir. Tilgreina skal tegund, stofn, uppruna, kyn, þyngd og/eða aldur tilraunadýranna. Nauðsynlegt er að þekkja skyldleikatengsl meðal dýranna til að komast hjá því að para systkini saman. Dýrunum skal skipt af handahófi í samanburðar- og meðferðarhópa (mælt er með lagskiptingu eftir líkamsþyngd). Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Hverju dýri skal úthlutað einkvæmu auðkennisnúmeri. Dýr af P-kynslóðinni skulu fá númerið áður en skammtagjöf hefst. Þegar um er að ræða dýr af F_1-kynslóðinni sem eru valin til pörunar skulu þau frá auðkennisnúmer við fráfærur. Halda skal skrár yfir öll F_1-dýr, sem hafa verið valin, þar sem fram kemur úr hvaða goti þau eru. Að auki er mælt með því að hver ungi sé auðkenndur sem fyrst eftir fæðingu ef til greina kemur að vigta hvern unga fyrir sig eða gera starfrænar prófanir.

Dýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu vera u.þ.b. 5–9 vikna gömul við upphaf skammtagjafar. Dýrin í öllum prófunarhópunum skulu vera svo svipuð sem unnt er að þyngd og aldri.

1.4. VERKFERLI

1.4.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Í hverjum prófunar- og samanburðarhópi skulu vera nægilega mörg dýr til að helst séu ekki færri en 20 kvendýr með fangi í hverjum hópi á gottíma eða rétt fyrir gottíma. Þegar um er að ræða efni, sem valda óæskilegum, meðferðartengdum áhrifum (t.d. ófrjósemi og kröftugum eiturhrifum eftir stærsta skammt), er ekki víst að þetta sé gerlegt. Markmiðið er að nógu mörg kvendýr festi fang til að unnt sé að vinna marktækt mat á mætti efnisins til að hafa áhrif á frjósemi, meðgöngu og atferli mæðra og á mjólkurgjöf, vöxt og þroskun F_1-afkvæmanna frá getnaði þar til þau eru fullþroska sem og á þroskun afkvæma þeirra (F_2) fram að fráfærum. Þetta þýðir að þótt ekki takist að fá nógu mörg kvendýr til að festa fang (þ.e. 20 kvendýr) er rannsóknin ekki endilega orðin ógild heldur er hægt að meta hvert tilvik fyrir sig.

1.4.2. **Tilreiðsla skammta**

Mælt er með því að prófunarefnið sé gefið um munn (með fóðri, drykkjarvatni eða magaslöngu) nema önnur íkomuleið (t.d. um húð eða við innöndun) sé talin heppilegri.

Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni, ef þess er kostur, en að öðrum kosti lausnir/yrulausnir í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir með öðrum burðarefnum komið til greina. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir. Ákvarða ber stöðugleika prófunarefnisins í burðarefninu.

1.4.3. **Skömmtun**

Nota skal a.m.k. þrjár skammtastærðir og samskeiða samanburð. Við val á stærsta skammtinum skal það haft að leiðarljósi, svo fremi að eðlisefnafræðilegir eða líffræðilegir eiginleikar prófunaríðefnisins setji því ekki skorður, að kalla fram eiturhrif en hvorki dauða né miklar þjáningar. Verði óvænt dauðsföll teljast rannsóknir þó yfirleitt gildar ef dánartíðnin er minni en u.þ.b. 10% hjá dýrum af foreldrakynslóðinni (P). Velja skal röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og ákvarða skammtastærðir þar sem engin merkjanleg, skaðleg áhrif koma fram (NOAEL). Oft er ákjósanlegt að nota stuðulinn 2–4 þegar bil milli stigminnkandi skammta eru ákveðin og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að nota mjög stór bil á milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10). Við fóðurrannsóknir skal bil á milli skammtastærða ekki vera meira en þrefalt. Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af fyrirliggjandi gögnum um eiturhrif, einkum niðurstöðum úr rannsóknum með endurtekinni skammtagjöf. Einnig skal vega og meta allar fyrirliggjandi upplýsingar um efnaskipti og hvarfafræði prófunarefnisins eða skyldra efna. Auk þess koma þessar upplýsingar einnig að gagni við að sýna fram á að skömmtunaráætlunin sé fullnægjandi.

Samanburðarhópurinn skal vera hópur sem fær ekki meðferð eða samanburðarhópur sem fær eingöngu burðarefni ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður. Ef prófunarefni er gefið með fóðrinu og það veldur því að dregur úr fóðuráti eða fóðurnýtingu getur verið nauðsynlegt að nota samanburðarhóp sem er fóðraður samhliða. Að öðrum kosti má nota gögn úr stýrðum rannsóknum, sem eru hannaðar til að meta áhrif minnkandi fóðuráts á æxlunarmæliþætti, í stað samskeiða samanburðarhóps sem er fóðraður samhliða.

Hafa skal í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins og annarra aukefna: áhrif á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins, áhrif á efnafræðilega eiginleika prófunarefnisins, sem geta breytt eitureiginleikum þess, og áhrif á fóðurát eða vatnsdrykkju eða næringarástand dýranna.

1.4.4. **Markprófun**

Ef rannsókn á gjöf um munn með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag eða samsvarandi hundraðshluti í fóðri eða drykkjarvatni, þar sem notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, framkallar engin merkjanleg eiturhrif, hvorki hjá dýrum af foreldrakynslóð né hjá afkvæmum þeirra, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu og/eða efnaskiptum kann fullnaðarrannsókn með mörgum mismunandi skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að gefa þurfi stærri skammt um munn. Þegar íkomuleið er önnur, t.d. við innöndun eða um húð, geta eðlisefnafræðilegir eiginleikar prófunarefnisins, s.s. leysni, oft gefið tilkynna og takmarkað váhrifastigið sem unnt er að ná að hámarki.

1.4.5. **Gjöf skammta**

Prófunarefnið skal gefið dýrunum sjö daga í hverri viku. Mælt er með gjöf um munn (í fóðri eða drykkjarvatni eða með magaslöngu). Séu notaðar aðrar íkomuleiðir þarf að rökstyðja það og gera viðeigandi breytingar ef nauðsyn krefur. Öll dýrin skulu fá skammtana með sömu aðferð á viðkomandi tímabili tilraunarinnar. Þegar prófunarefni er gefið í maga er rétt að nota magaslöngu til þess. Rúmmál vökva, sem er gefinn í einu, ætti ekki að vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar (0,4 ml/100 g líkamsþyngdar er hámarkið þegar um er að ræða maísolíu) nema um sé að ræða vatnslausnir en þá má gefa 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir. Í rannsóknum þar sem gefið er með magaslöngu skal að jafnaði aðeins gefa ungum prófunarefnið óbeint með mjólkinni þar til farið er að gefa þeim skammta beint við fráfærur. Í rannsóknum þar sem prófunarefnið er gefið með fóðri eða drykkjarvatni, fá ungarnir prófunarefnið að auki beint þegar þeir byrja að éta fóður sjálfir síðustu viku mjólkurskeiðsins.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vökvajafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort fastan styrk (í milljónarhlutum) í fóðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna en taka skal fram hvor kosturinn er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann a.m.k. vikulega svo að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Vega skal og meta upplýsingar um dreifingu í fylgju þegar ákvarða skal skammt sem gefinn er um magaslöngu og miðast við þyngd.

1.4.6. **Tilraunaáætlanir**

Karl- og kvendýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu fyrst fá daglega skammta þegar þau eru orðin 5–9 vikna gömul. Dagleg skömmtun F_1-karldýra og -kvendýra skal hefjast við fráfærur og skal hafa í huga að þegar prófunarefni er gefið með fóðri eða drykkjarvatni geta F_1-ungarnir orðið fyrir beinum váhrifum af prófunarefninu strax á mjólkurskeiðinu. Skömmtun skal haldið áfram fyrir bæði kynin (P og F_1) í a.m.k. 10 vikur áður en pörunartímabilið hefst. Skömmtun er haldið áfram hjá báðum kynjum á tveggja vikna pörunartímabilinu. Karldýrin skulu aflífuð á mannúðlegan hátt og skoðuð þegar þeirra er ekki lengur þörf vegna mats á áhrifum á æxlun. Kvendýr af foreldrakynslóðinni (P) skulu áfram fá skammt alla meðgönguna og allt fram að fráfærum F_1-afkvæma þeirra. Vega skal og meta hvort breyta skuli skömmtunaráætluninni ef tiltækar upplýsingar um prófunarefnið gefa tilefni til þess, þ.m.t. fyrirliggjandi gögn um eiturhrif, vakningu efnaskipta eða uppsöfnun í lífverum. Skammturinn, sem hvert dýr fær, skal að jafnaði miðast við nýjustu ákvörðunina á líkamsþyngd þess. Þó skal sýna varkárni þegar skammturinn er leiðréttur á síðasta þriðjungi meðgöngu.

Halda skal áfram meðferð karldýra og kvendýra af P- og F_1-kynslóð uns rannsókn lýkur. Öll fullvaxin karldýr og kvendýr af P- og F_1-kynslóð skulu aflífuð á mannúðlegan hátt þegar þeirra er ekki lengur þörf til mats á áhrifum á æxlun. Afkvæmi af F_1-kynslóð, sem eru ekki valin til pörunar, og öll afkvæmi af F_2-kynslóð skulu aflífuð á mannúðlegan hátt eftir fráfærur.

1.4.7. **Pörunaraðferð**

1.4.7.1. *Pörun foreldrakynslóðar (P)*

Við hverja pörun skal hvert kvendýr haft með einu karldýri sem fær sömu skammtastærð (1:1 pörun) þar til mökun á sér stað eða 2 vikur eru liðnar. Á hverjum degi er leitað að sæði eða leggangatappa í

kvendýrunum. Dagurinn þegar leggangatappi eða sæði finnst telst vera núlldagur meðgöngu. Ef pörun mistekst má reyna að para kvendýrið á ný saman við karldýr sem hefur reynst frjótt. Pörunardýr skulu auðkennd á skýran hátt í gögnunum. Varast skal að para systkini saman.

1.4.7.2. *Pörun F_1-kynslóðar*

Þegar afkvæmi af F_1-kynslóð eru pöruð skal við fráfærur velja a.m.k. eitt karldýr og eitt kvendýr úr hverju goti til pörunar við aðra unga, sem fá sömu skammtastærð en eru úr öðru goti, til að fá fram F_2-kynslóðina. Velja skal unga úr hverju goti af handahófi þegar enginn marktækur munur er á líkamsþyngd eða útliti unga úr sama goti. Komi fram slíkur munur skal velja þau dýr sem eru dæmigerðust í sínum gothópi. Heppilegast virðist að gera þetta á grundvelli líkamsþyngdar en það getur átt betur við að velja dýrin eftir útliti. Ekki skal para F_1-afkvæmi fyrr en þau hafa náð fullum kynþroska.

Pör án afkvæma skulu rannsökuð til að ákvarða líklega ástæðu fyrir ófrjóseminni. Þetta má t.d. gera með því að leyfa dýrunum að maka sig með öðrum karl- eða kvendýrum sem hafa reynst frjósöm, með smásjárathugun á æxlunarfærum dýranna og með því að kanna gangferilinn eða sæðismyndunina.

1.4.7.3. *Önnur pörun*

Í tilteknum tilvikum, s.s. við meðferðartengdar breytingar á gotstærð eða athuganir á óvissuáhrifum í fyrstu pörun, er mælt með því að dýr af P-kynslóð eða fullvaxin dýr af F_1-kynslóð séu pöruð aftur til að framkalla annað got. Mælt er með því að para aftur afkvæmalaus kvendýr eða karldýr með dýrum af hinu kyninu sem hafa reynst frjósöm. Ef nauðsynlegt er talið að fá fram annað got hjá annarri hvorri kynslóðinni skulu dýr pöruð aftur u.þ.b. einni viku eftir fráfærur unga úr síðasta goti.

1.4.7.4. *Gotstærð*

Dýrin skulu fá að gjóta á eðlilegan hátt og ala afkvæmi sín fram að fráfærum. Valfrjálst er að staðla stærð gothópsins. Við stöðlun skal lýsa ítarlega aðferðinni sem er notuð.

1.5. ATHUGANIR

1.5.1. **Klínískar athuganir**

Gera skal almennar klínískar athuganir á hverjum degi og sé um að ræða skammtagjöf með magaslöngu skal athugunartíminn valinn með hliðsjón af því tímabili þar sem áætlað er að hámarksáhrif af skammtagjöfinni komi fram. Skrá skal breytingar á atferli, merki um erfitt eða langvarandi got og öll merki um eiturhrif. Fara skal fram ítarlegri viðbótarathugun á hverju dýri a.m.k. einu sinni í viku og mætti til hagræðis gera það um leið og dýrið er vigtað. Athuga skal öll dýr tvisvar á dag (einu sinni á dag um helgar ef við á) með tilliti til sjúkdómsástands og dauða.

1.5.2. **Líkamsþyngd og fóðurát og vatnsdrykkja dýra af foreldrakynslóð (e. *parent animals*)**

Dýr af foreldrakynslóð (P- og F_1-kynslóð) skulu vigtuð á fyrsta degi skömmtunar og a.m.k. vikulega eftir það. Kvendýr af foreldrakynslóð (P- og F_1-kynslóð) skulu vigtuð a.m.k. á núlldegi og 7., 14. og 20. eða 21. degi meðgöngu og á mjólkurskeiðinu á sömu dögum og ungarnir eru vigtaðir, svo og þann dag sem dýrin eru aflífuð. Þessar athuganir ber að skrá fyrir hvert fullvaxta dýr um sig. Mæla skal fóðurát a.m.k. vikulega á tímabilinu áður en pörun á sér stað og á meðgöngunni. Vatnsdrykkju skal mæla a.m.k. vikulega ef prófunarefnið er sett út í vatnið.

1.5.3. **Gangferill**

Meta skal lengd gangferils og hvort hann er eðlilegur hjá kvendýrum af P- og F_1-kynslóð með stroki úr leggöngum áður en pörun á sér stað og, að eigin vali, meðan á pörun stendur, þar til staðfesting fæst á því að mökun hafi átt sér stað. Þegar frumur eru teknar úr leggöngum eða leghálsi skal gæta varúðar svo að ekki verði röskun á slímhúð sem gæti leitt til sýndarþungunar síðar (1. heimild).

1.5.4. **Mæliþættir í sæði**

Við lok tilraunarinnar skal skrá þyngd á eistum og eistalyppum allra P- og F_1-karldýra og geyma skal eitt af hvoru líffæri fyrir vefjameinafræðilegar rannsóknir (sjá liði 1.5.7 og 1.5.8.1). Afgangurinn af eistunum og eistalyppunum, sem fást úr undirhópi sem í eru a.m.k. tíu karldýr úr hverjum hópi P- og F_1-karldýra,

skal notaður fyrir talningu á einsleitniþolnum (e. *homogenisation-resistant*) forsæðisfrumum (e. *spermatids*) annars vegar og sæðisfrumuforða í eistalyppurófu (e. *cauda epididymal sperm reserve*) hins vegar. Úr þessum sama undirhópi karldýra er hægt að safna sæðisfrumum úr eistalyppurófu eða sáðrás til að meta hreyfanleika og formfræði sæðisfrumna. Ef í ljós koma meðferðartengd áhrif eða ef vísbendingar liggja fyrir úr öðrum rannsóknum um hugsanleg áhrif á sæðismyndun skal leggja mat á sæðisfrumur allra karldýra í hverjum skammtahópi en að öðrum kosti má talningin takmarkast við P- og F_1-karldýr í samanburðarhópi og hópnum sem fær stærsta skammtinn.

Finna skal heildarfjölda einsleitniþolinna forsæðisfrumna í eistum og sæðisfrumur í eistalyppurófu (2. og 3. heimild). Finna má forða sæðisfrumna í eistalyppurófu út frá styrk og rúmmáli sæðis í svifblöndunni, sem er notuð til að ljúka öllu eigindlegu mati, og út frá fjölda sæðisfrumna sem endurheimtast eftir að það sem eftir er af vefnum úr eistalyppurófunni hefur verið malað og/eða gert einsleitt. Talningin skal gerð á undirhópi karldýra, sem eru valin úr öllum skammtahópum, strax eftir að dýrin eru aflífuð nema myndbandsupptökur eða stafrænar upptökur séu gerðar eða sýnin séu fryst og greind síðar. Í þeim tilvikum má greina fyrst samanburðarhópana og hópinn sem fær stærsta skammtinn. Ef engin meðferðartengd áhrif (t.d. áhrif á fjölda, hreyfanleika eða formfræði sæðisfrumna) koma í ljós þarf ekki að greina sýni úr hinum skammtahópunum. Ef vart verður við meðferðartengd áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig meta hópana sem fá minni skammta.

Hreyfanleiki sæðisfrumna úr eistalyppum (eða sáðrás) skal metinn eða tekinn upp á myndband strax eftir aflífun. Sæðisfrumur skulu heimtar með þeim hætti að þær skaðist sem minnst og síðan þynntar með viðunandi aðferðum fyrir greiningu á hreyfanleika (4. heimild). Hundraðshluti sæðisfrumna með stigvaxandi hreyfanleika skal ákvarðaður annaðhvort á huglægan eða hlutlægan hátt. Í tölvustuddri greiningu á hreyfanleika (5.–10. heimild) styðst útleiðsla á stigvaxandi hreyfanleika við notandaskilgreind þröskuldsgildi fyrir meðalferilhraða og réttlínuleika (e. *straightness*) eða línulegan vísi. Ef myndbands-upptaka er gerð af sýnum (11. heimild) eða myndir teknar upp á annan hátt við krufningu er hægt að einskorða síðari greiningu við P- og F_1-karldýr í samanburðarhópi og hópnum sem fær stærsta skammtinn nema meðferðartengd áhrif komi í ljós en í því tilviki skal einnig meta hópana sem fá minni skammta. Séu engar myndbandsupptökur eða stafrænar myndir til skulu öll sýni í öllum meðferðarhópum greind við krufningu.

Gera skal formfræðilegt mat á sæðisfrumusýni úr eistalyppu (eða sáðrás). Sæðisfrumurnar (a.m.k. 200 í hverju sýni) skulu rannsakaðar í festum, fullbúnum votsýnum (12. heimild) og flokkaðar annaðhvort sem eðlilegar eða óeðlilegar. Dæmi um formfræðilega galla sæðisfrumna eru t.d. samruni, stök höfuð og afmynduð höfuð og/eða halar. Meta skal undirhóp karldýra, sem eru valin úr öllum skammtahópum, annaðhvort strax eftir að dýrin eru aflífuð eða síðar ef matið byggist á myndbandsupptökum eða stafrænum upptökum. Stroksýni, sem búið er að festa, má einnig rannsaka síðar. Í þeim tilvikum má greina fyrst samanburðarhópana og hópinn sem fær stærsta skammtinn. Ef engin meðferðartengd áhrif (t.d. áhrif á formfræði sæðisfrumna) koma í ljós þarf ekki að greina sýni úr hinum skammtahópunum. Ef vart verður við meðferðartengd áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig meta hópana sem fá minni skammta.

Ef einhverjir af fyrrgreindum mæliþáttum fyrir mat á sæðisfrumum hafa þegar verið rannsakaðar sem hluti af rannsókn á altækum eiturhrifum, sem stendur a.m.k. í 90 daga, er ekki nauðsynlegt að endurtaka þær í tveggja kynslóða rannsókninni. Þó er mælt með því að sýni af sæðisfrumum P-kynslóðarinnar eða stafræn upptaka með þeim verði geymd til að unnt verði að meta þau síðar ef nauðsyn krefur.

1.5.5. **Afkvæmi**

Rannsaka skal hvern gothóp eins fljótt og hægt er að loknu goti (núlldagur mjólkurskeiðs) til að ákvarða fjölda og kyn unganna, fjölda andvana fæddra, fjölda lifandi unga og stórsæ frábrigði. Ef ungar, sem finnast dauðir á núlldegi eru nógu heillegir, er æskilegt að þeir séu skoðaðir, til að leita að hugsanlegum göllum og dánarorsök, og varðveittir. Lifandi ungar skulu taldir og vigtaðir hver um sig við fæðingu (núlldagur mjólkurskeiðs) eða á fyrsta degi og reglulega eftir það á föstum vigtunardögum, t.d. á 4., 7., 14. og 21. degi mjólkurskeiðs. Líkamlegur eða atferlislegur afbrigðileiki, sem kemur í ljós hjá mæðrum eða afkvæmum, skal skráður.

Líkamleg þroskun afkvæmanna skal fyrst og fremst skráð sem aukning á líkamsþyngd. Aðrar líkamlegir mæliþættir (t.d. eyrna- og augnaop, tannkoma og hárvöxtur) geta gefið frekari upplýsingar en þessi gögn skulu helst metin í tengslum við gögn um kynþroska (t.d. aldur og líkamsþyngd við opnun legganga eða aðskilnað reðurhúfu og forhúðar (e. *balano-preputial separation*) (13. heimild). Mælt er með starfrænum rannsóknum (s.s. á hreyfistarfsemi, starfsemi skynfæra og taugaviðbrögðum) hjá afkvæmum af F_1-kynslóð fyrir og/eða eftir fráfærur, einkum þeim rannsóknum sem tengjast kynþroska, ef slíkar rannsóknir eru ekki hluti af sjálfstæðum rannsóknum. Ákvarða þarf aldur við opnun legganga og aðskilnað reðurhúfu og forhúðar hjá F_1-ungum sem hafa verið vandir af spena og valdir til pörunar. Mæla skal bil milli endaþarmsops og limrótar (e. *anogenital distance*) á núlldegi eftir fæðingu hjá F_2-ungum ef orðið hafa breytingar á kynjahlutfalli eða kynþroskaaldri hjá F_1-kynslóðinni.

Sleppa má starfrænum athugunum í hópum þar sem á annan hátt má sjá greinileg merki um skaðleg áhrif (t.d. þegar verulega dregur úr þyngdaraukningu o.s.frv.). Ef starfrænar rannsóknir eru gerðar skal ekki gera þær á ungum sem valdir eru til pörunar.

1.5.6. **Stórsæ krufning**

Við lok meðferðar eða við dauða í rannsókninni skulu öll dýr af foreldrakynslóð (P og F_1), allir ungar með afbrigðileika í ytri gerð eða klínísk einkenni, svo og einn ungi af hvoru kyni og úr hverju goti sem er valinn af handahófi úr bæði F_1- og F_2-kynslóðinni, sett í stórsæja rannsókn til að leita að hvers konar frávikum í líkamsbyggingu eða meinafræðilegum breytingum. Gefa skal líffærum æxlunarkerfisins sérstakan gaum. Rannsaka skal unga, sem eru aflífaðir mannúðlega þegar þeir eru dauðvona, og dauða unga, ef þeir eru nægilega heillegir, til að leita að hugsanlegum göllum og/eða til að finna dánarorsökina, og varðveita þá.

Rannsaka skal leg allra kvendýra, sem eru pöruð í fyrsta sinn, á þann hátt að það spilli ekki vefjameinafræðilegu mati, með tilliti til þess hvort hreiðrun hafi átt sér stað og þá hve mörg tilvikin eru.

1.5.7. **Þyngd líffæra**

Við lok meðferðar skal ákvarða líkamsþyngd og þyngd á eftirfarandi líffærum í öllum dýrum af P- og F_1-foreldrakynslóð (pöruð líffæri skulu vigtuð hvort í sínu lagi):

— legi, eggjastokkum,

— eistum, eistalyppu (í heild og eistalyppurófu),

— blöðruhálskirtli,

— sáðblöðrum með hlaupkirtlum og tilheyrandi vökva og blöðruhálskirtli (sem einni heild),

— heila, lifur, nýrum, milta, heiladingli, skjaldkirtli og nýrnahettum og þekktum marklíffærum.

Líkamsþyngd í lok tilraunar skal ákvörðuð fyrir unga af F_1- og F_2-kynslóð sem eru valdir til krufningar. Eftirfarandi líffæri úr einum unga, völdum af handahófi af hvoru kyni og fyrir hvert got (sjá lið 1.5.6), skulu vigtuð: heili, milta og hóstarkirtill.

Niðurstöður úr stórsærri krufningu og vigtun líffæra skulu metnar í tengslum við athuganir sem gerðar eru í öðrum rannsóknum með endurteknum skömmtum, ef unnt er.

1.5.8. **Vefjameinafræði**

1.5.8.1. *Dýr af foreldrakynslóð*

Eftirfarandi líffæri og vefir úr dýrum af foreldrakynslóð (P- og F_1-kynslóð) eða dæmigerð sýni úr þeim skulu fest og geymd í viðeigandi miðli fyrir vefjameinafræðilega rannsókn:

— leggöng, leg ásamt leghálsi og eggjastokkar (varðveitt í hæfilegu festiefni),

— eitt eista (varðveitt í Bouin-festiefni eða samsvarandi festiefni), ein eistalyppa, sáðblöðrur, blöðruhálskirtill og hlaupkirtill,

— áður tilgreint eða tilgreind marklíffæri úr öllum dýrum af P- og F_1-kynslóð sem valin eru til pörunar.

Framkvæma skal fulla vefjameinafræðilega rannsókn á varðveittum líffærum og vefjum, sem tilgreind eru hér að framan, fyrir öll dýr af P- og F_1-kynslóð í samanburðarhópi og hópnum, sem fékk stærsta skammtinn, sem valin eru til pörunar. Rannsókn á eggjastokkum dýra af P-kynslóð er valfrjáls. Einnig skal rannsaka líffæri sem sýna merki um meðferðartengdar breytingar í hópum sem fá litla eða meðalstóra skammta til að fá skýrari vitneskju um mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL). Auk þess skal fara fram vefjameinafræðilegt mat á æxlunarfærum dýra sem fá lítinn eða meðalstóran skammt ef grunur er um skerta frjósemi hjá þeim, t.d. æxlunarfærum dýra sem parast ekki, taka ekki fang, frjóvga ekki eða fæða ekki heilbrigð afkvæmi eða dýra þar sem áhrifa gætir á gangferil eða fjölda, hreyfanleika eða formfræði sæðisfrumna. Rannsaka skal allar stórsæjar vefjaskemmdir, s.s. rýrnun eða æxli.

Fara skal fram ítarleg vefjameinafræðileg rannsókn á eistum (t.d. með því að nota Bouin-festiefni, paraffínlögn og þversneiðar sem eru 4–5 µm að þykkt) til að greina meðferðartengd áhrif, s.s. það að forsæðisfrumur skila sér ekki, kímfrumulög eða -gerðir vantar, fjölkjörnóttar risafrumur sjást eða

sæðismyndunarfrumur losna inn í hol sáðpíplanna (14. heimild). Rannsókn á óskemmdum eistalyppum skal ná yfir höfuð, bol og rófu þeirra (lat. caput, corpus og cauda) og hana má framkvæma með mati á langsniði af þeim. Meta skal eistalyppur með tilliti til hvítkornaíferðar, breytinga á algengi frumugerða, afbrigðilegra frumugerða og agnáts á sæðisfrumum. Nota má PAS-litun og litun með hematoxýlíni til að rannsaka æxlunarfæri karldýra.

Að loknu mjólkurskeiði skulu eggjastokkarnir innihalda frumeggbú og eggbú í vexti, svo og stór gulbú frá mjólkurskeiði. Í vefjameinafræðilegri rannsókn skal greina eigindlega skerðingu á þýði frumeggbúa. Vinna skal megindlegt mat á frumeggbúum hjá F_1-kvendýrum og skal fjöldi dýra, val eggjastokkasneiða og sýnasneiðafjöldi vera tölfræðilega viðeigandi miðað við þá matsaðferð sem er notuð. Í rannsókninni skal m.a. finna út fjölda frumeggbúa, sem má sameina litlum eggbúum í vexti, til samanburðar á eggjastokkum dýra sem fá meðferð og dýra í samanburðarhópum (15.–19. heimild).

1.5.8.2. *Fráfæruungviði*

Stórsæilega afbrigðilegir vefir og marklíffæri úr öllum ungum með afbrigðileika í ytri gerð eða klínísk einkenni skulu fest og varðveitt í viðeigandi miðli fyrir vefjameinafræðilega rannsókn, svo og úr einum unga af hvoru kyni og úr hverju goti sem er valinn af handahófi úr dýrum af bæði F_1- og F_2-kynslóð sem hafa ekki verið valin til pörunar. Setja skal fram fulla vefjameinafræðilega lýsingu á varðveittum vef með sérstakri áherslu á líffæri í æxlunarfærum.

2. GÖGN

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn fyrir hvert dýr og setja þau í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp og hverja kynslóð, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófuninni eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi frjórra dýra, fjöldi kvendýra með fangi, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, hvers konar athuganir voru gerðar á foreldrum og afkvæmum og hvers konar vefjameinafræðilegar breytingar urðu, auk allra gagna um gotið sem máli skipta.

Meta skal tölulegar niðurstöður með viðeigandi og almennt viðurkenndri tölfræðiaðferð og skal val á tölfræðiaðferðum vera liður í hönnun rannsóknarinnar og vera rökstutt. Tölfræðilíkön um tengsl milli skammts og svörunar geta verið gagnleg við greiningu gagna. Í skýrslunni skulu koma fram nógu miklar upplýsingar um greiningaraðferðina og tölvuforritið sem notað var til að óháður rýnir/tölfræðingur geti endurmetið og endurgert greininguna.

2.2. MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Meta skal niðurstöðurnar úr þessari rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlum hjá tveimur kynslóðum með tilliti til þeirra áhrifa sem verður vart, þ.m.t. niðurstöður úr krufningum og smásjárrannsóknum. Mat á gögnum skal ná til tengsla, eða tengslaleysis, milli skammtsins af prófunarefninu annars vegar og þess hvort frávik koma fram eða ekki og tíðni og alvarleika frávika hins vegar, þ.m.t. stórsæjar vefjaskemmdir, tiltekin marklíffæri, áhrif á frjósemi, klínísk frávik, áhrif á æxlun og got, breytingar á líkamsþyngd, áhrif á dánartíðni og öll önnur eiturhrif. Við mat á prófunarniðurstöðum skal taka tillit til eðlisefnafræðilegra eiginleika prófunarefnisins og, liggi þau fyrir, til gagna um eiturefnahvörf.

Vel útfærð rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun ætti að gefa viðunandi mat á núláhrifagildi og skilning á skaðlegum áhrifum á æxlun, got, mjólkurskeið og þroskun eftir fæðingu, þ.m.t. varðandi vöxt og kynþroska.

2.3. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Rannsókn á skaðlegum áhrifum á æxlun hjá tveimur kynslóðum veitir upplýsingar um áhrif endurtekinna váhrifa efnis á öllum stigum æxlunarferlisins. Einkum veitir rannsóknin upplýsingar um æxlunarmæliþætti og um þroskun, vöxt, kynþroska og lifun afkvæma. Niðurstöður rannsóknarinnar skulu túlkaðar í samhengi við niðurstöður úr rannsóknum á hálflangvinnum eiturhrifum, rannsóknum á eiturhrifum á þroskun fyrir fæðingu, rannsóknum á eiturefnahvörfum og öðrum fyrirliggjandi rannsóknum. Niðurstöður úr þessari rannsókn má nota til að meta þörf á frekari prófunum á tilteknu íðefni. Hægt er að yfirfæra niðurstöður rannsóknarinnar á menn að vissu marki. Þær nýtast best til að veita upplýsingar um skammtastærðir sem hafa engin merkjanleg áhrif og um leyfileg váhrif hjá mönnum (20., 21., 22–23. heimild).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— auðkennisgögn,

— hreinleiki.

Burðarefni (ef við á):

— rök fyrir vali á burðarefni, ef það er ekki vatn.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður, efni í bæli o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður og þá styrkleika sem náðust,

— stöðugleiki og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

Niðurstöður:

— fóðurát og einnig vatnsdrykkja, ef um hana er vitað, nýting fóðurs (aukning líkamsþyngdar á hvert gramm fóðurs sem er étið) og hversu mikið dýr af P- og F_1-kynslóð innbyrða af prófunarefninu, nema á þeim tíma sem dýrin lifa saman og á a.m.k. síðasta þriðjungi mjólkurskeiðsins,

— gögn um frásog, liggi þau fyrir,

— gögn um líkamsþyngd dýra af P- og F_1-kynslóð sem eru valin til pörunar,

— gögn um þyngd gots og einstakra unga,

— líkamsþyngd við aflífun og gögn um raunþyngd og hlutfallslega þyngd líffæra úr dýrum af foreldrakynslóð,

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau eru geta gengið til baka eða ekki),

— dauðastund í rannsókninni eða hvort dýrin lifa til loka rannsóknarinnar,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammti, þ.m.t. stuðlar fyrir pörun, frjósemi, meðgöngu, fæðingu, lífvænleika og mjólkurskeið og skal í skýrslunni tilgreina þær tölulegu upplýsingar sem hafa verið notaðar til þess að reikna þessa stuðla,

— eiturhrif eða önnur áhrif á æxlun, afkvæmi, vöxt eftir fæðingu o.s.frv.,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— fjöldi P- og F_1-kvendýra með eðlileg gangmál og gangferil af eðlilegri lengd,

— heildarfjöldi sæðisfrumna í eistalyppurófu, hundraðshluti sæðisfrumna með stigvaxandi hreyfanleika, hundraðshluti eðlilegra sæðisfrumna að því er varðar formfræði og hundraðshluti sæðisfrumna með hverju tilgreindu frávikanna,

— tími fram að mökun, gefinn upp í fjölda daga,

— lengd meðgöngu,

— fjöldi tilvika, þar sem hreiðrun hefur orðið, og fjöldi gulbúa og gotstærð,

— fjöldi lifandi fæddra unga og fósturláta eftir hreiðrun,

— fjöldi unga með stórsæjum frávikum og, ef það er metið, fjöldi ófullburða afkvæma,

— gögn um líkamleg einkenni unga og önnur gögn um þroskun eftir fæðingu; rökstyðja skal valið á þeim líkamlegu einkennum sem mat er lagt á,

— gögn um athuganir á starfrænum þáttum hjá ungum og fullvöxnum dýrum, eftir því sem við á,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður, þ.m.t. gildi fyrir mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL) á móður og afkvæmi.

4. **HEIMILDIR**

1) Sadleir, R.M.F.S., (1979) Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilisation, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

2) Gray, L.E. et al., (1989) A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. Fundamental and Applied Toxicology, 12, bls. 92-108.

3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. Journal of Reproduction and Fertility 54:103-107.

4) Klinefelter, G.R. et al., (1991) The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. Reproductive Toxicology, 5, bls. 39-44.

5) Seed, J. et al., (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. Reproductive Toxicology, 10(3), bls. 237-244.

6) Chapin, R.E. et al., (1992) Methods for Assessing Rat Sperm Motility. Reproductive Toxicology, 6, bls. 267-273

7) Klinefelter, G.R. et al., (1992) Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. Journal of Andrology, 13, bls. 409-421.

8) Slott, V.L. et al., (1991) Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. Reproductive Toxicology, 5, bls. 449-458.

9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993) Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: Methods in Toxicology, Part A., Academic, Orlando, Florida, bls. 319-333.

10) Toth, G.P. et al., (1989) The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology, 10, bls. 401-415.

11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987) Computerised Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology, 8, bls. 330-337.

12) Linder, R.E. et al., (1992) Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology, 6, bls. 491-505.

13) Korenbrot, C.C. et al., (1977) Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction, 17, bls. 298-303.

14) Russell, L.D. et al., (1990) Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993) Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, bls. 421-426.

17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989) Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

18) Smith, B.J. et al., (1991) Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology, 5, bls. 379-383.

19) Heindel, J.J., (1999) Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

20) Thomas, J. A., (1991) Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989) Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

22) Palmer, A.K., (1981) In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

23) Palmer, A.K., (1978) In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

B.36. **EITURHVARFAFRÆÐI**

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er gefið eftir viðeigandi íkomuleið. Háð tilganginum með rannsókninni má gefa einum eða nokkrum hópum tilraunadýra efnið í einum skammti eða endurteknum skömmtum á skilgreindum tímabilum. Eftir því hvers konar rannsókn er gerð eru prófunarefnið og/eða umbrotsefni þess síðan ákvörðuð í líkamsvökvum, vefjum og/eða úrgangsefnum.

Rannsóknirnar má gera með „ómerktum“ eða „merktum“ formum prófunarefnisins. Ef notuð er merking skal staðsetja hana þannig í efninu að hún veiti sem mestar upplýsingar um afdrif efnasambandsins.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Engar.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Undirbúningur**

Heilbrigð, ung, fullvaxin dýr eru látin aðlagast aðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga áður en prófun hefst. Fyrir prófun eru dýr valin af handahófi og skipað í meðferðarhópana. Við sérstakar aðstæður má nota mjög ung dýr, dýr með fangi eða dýr sem hafa áður fengið meðferð.

1.6.2. **Prófunarskilyrði**

1.6.2.1. *Tilraunadýr*

Við rannsóknir á eiturefnahvörfum má nota eina eða fleiri hentugar dýrategundir og skal þar taka mið af því hvort dýrategundin hefur verið notuð, eða hvort fyrirhugað er að nota hana, í öðrum eiturefnafræðilegum rannsóknum á sama prófunarefni. Ef nagdýr eru notuð í prófun ætti breytileiki í þyngd þeirra ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalþyngdinni.

1.6.2.2. *Fjöldi og kyn*

Við rannsóknir á frásogi og útskilnaði skulu vera fjögur dýr í hverjum skammtahópi í upphafi. Ekki eru gerðar kröfur varðandi kyn dýranna en við sumar aðstæður kann að vera nauðsynlegt að rannsaka bæði kynin. Sé munur á svörun eftir kyni skal prófa fjögur dýr af hvoru kyni. Ef um er að ræða rannsóknir með dýrum sem ekki eru nagdýr má nota færri dýr. Þegar dreifing í vefjum er rannsökuð ætti bæði að miða stærð hóps í upphafi við fjölda dýra, sem á að aflífa á hverjum tímapunkti, og við fjölda þessara rannsóknartímapunkta.

Þegar efnaskipti eru rannsökuð fer stærð hóps eftir þörfum í rannsókninni. Þegar um er að ræða rannsóknir með mörgum skömmtum og mörgum tímapunktum skal miða stærð hóps við fjölda tímapunkta og fyrirhugaðan fjölda aflífana en þó mega ekki vera færri en tvö dýr í hópi. Hópar skulu vera nógu stórir til að viðunandi lýsing fáist á upptöku, jafnvægisstyrk og brotthvarfi (eftir því sem við á) prófunarefnis og/eða umbrotsefna.

1.6.3. **Skammtastærðir**

Ef prófunarefnið er aðeins gefið í einum skammti skal nota minnst tvær skammtastærðir. Nota skal lítinn skammt, þar sem engin eiturhrif koma fram, og stóran skammt þar sem breytingar geta orðið á mæliþáttum fyrir eiturefnahvörf eða eiturhrif komið fram.

Ef um er að ræða endurtekna skammtagjöf nægir litli skammturinn yfirleitt en við tilteknar aðstæður verið nauðsynlegt að nota líka stóran skammt.

1.6.4. **Íkomuleið**

Við rannsóknir á eiturefnahvörfum skal nota sömu íkomuleið og, eftir því sem við á, sama burðarefni og eru notuð eða fyrirhugað er að nota við hinar eiturhrifarannsóknirnar. Prófunarefnið er venjulega gefið hópum tilraunadýra í tiltekinn tíma um munn með magaslöngu eða í fóðri, borið á húð eða gefið við innöndun. Inngjöf prófunarefnisins í bláæð getur hentað til að ákvarða hlutfallslegt frásog um aðrar leiðir. Að auki geta fengist gagnlegar upplýsingar um mynstur dreifingar fljótlega eftir inngjöf efnis í bláæð.

Taka skal tillit til þess að burðarefnið kann að hafa truflandi áhrif á prófunarefnið. Hafa skal í huga mismuninn á frásogi, eftir því hvort prófunarefnið er gefið með magaslöngu eða í fóðri, og einnig þörfina fyrir nákvæma ákvörðun skammta, einkum þegar prófunarefnið er gefið í fóðri.

1.6.5. **Athugunartímabil**

Athuga skal öll dýrin daglega og skrá merki um eiturhrif og önnur markverð klínísk atriði, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve mikil þau eru og hve lengi þau vara.

1.6.6. **Verkferli**

Eftir að tilraunadýrin hafa verið vigtuð er prófunarefnið gefið eftir viðeigandi íkomuleið. Ef það er talið skipta máli má láta dýrin fasta áður en prófunarefnið er gefið.

Frásog

Hægt er að meta hraða og umfang á frásogi inngefins efnis með ýmsum aðferðum, með eða án viðmiðunarhópa ([1]), t.d.:

— með ákvörðun á magni prófunarefnisins og/eða umbrotsefna þess í úrgangi, s.s. þvagi, galli, saur og útöndunarlofti, og á því magni sem eftir er í hræinu eftir aflífun,

— með samanburði á líffræðilegri svörun (t.d. í rannsóknum á bráðum eiturhrifum) í tilrauna- og samanburðar- og/eða viðmiðunarhópum,

— með samanburði á því magni prófunarefnis og/eða umbrotsefna þess sem skilst út um nýrun í prófunar- og viðmiðunarhópum,

— með ákvörðun á flatarmálinu undir ferlinum, sem sýnir blóðvökvastyrk/tíma fyrir prófunarefnið og/eða umbrotsefnin, og með samanburði við gögn frá viðmiðunarhóp.

Dreifing

Tvær aðferðir eru tiltækar sem stendur til að greina dreifingarmynstur og má nota aðra þeirra eða báðar:

— nytsamlegar, eigindlegar upplýsingar fást með því að nota tækni til eigingeislunarmyndatöku (e. *autoradiography*) á allan skrokkinn,

— megindlegar upplýsingar fást með því að aflífa dýr á mismunandi tímum eftir að þau hafa orðið fyrir váhrifum og ákvarða svo styrk og magn prófunarefnisins og/eða umbrotsefna í vefjum og líffærum.

([1]) Í þessari aðferð er viðmiðunarhópur sá hópur sem fær prófunarefnið eftir annarri íkomuleið sem tryggir fullkomið lífaðgengi skammtsins.

Útskilnaður

Í útskilnaðarrannsóknum er safnað þvagi, saur og útöndunarlofti og, við tilteknar aðstæður, galli. Magn prófunarefnisins og/eða umbrotsefnanna í þessum úrgangi skal mælt nokkrum sinnum eftir að dýrin hafa orðið fyrir váhrifum, annaðhvort þar til um 95% af skammtinum, sem gefinn var, hefur skilist út eða í sjö daga, eftir því hvort tímabilið er styttra.

Í sérstökum tilvikum getur verið nauðsynlegt að meta útskilnað prófunarefnisins í mjólk úr mjólkandi tilraunadýrum.

Efnaskipti

Greina skal líffræðileg sýni með heppilegum aðferðum til að ákvarða umfang og mynstur efnaskipta. Ef svara þarf spurningum sem vöknuðu við fyrri eiturefnarannsóknir skal bygging umbrotsefna skýrð og sett fram tilgáta um líkleg efnaskiptaferli. Rannsóknir í glasi geta verið gagnlegar til að afla upplýsinga um efnaskiptaferli.

Frekari upplýsingar um sambandið milli efnaskipta og eiturhrifa má fá úr lífefnafræðilegum rannsóknum, s.s. með ákvörðun á áhrifum á ensímkerfi í efnaskiptum, brotthvarfi innrænna, prótínlausra súlfhýdríl-efnasambanda og bindingu efnisins við stórsameindir.

2. GÖGN

Taka skal gögnin saman í töflu og skýra þau, ef við á, með myndrænni framsetningu, allt eftir því hvers konar rannsókn var gerð. Þegar við á skal meðaltal og tölfræðilegan breytileika mælinga, fyrir hvern prófunarhóp, miðað við tíma, skömmtun, vefi og líffæri. Ákvarða skal umfang frásogs og magn og hraða útskilnaðar með viðeigandi aðferðum. Þegar gerðar eru efnaskiptarannsóknir skal tilgreina byggingu sanngreindra umbrotsefna og sýna hugsanleg efnaskiptaferli.

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Með hliðsjón af því hvers konar rannsókn var gerð skulu eftirfarandi upplýsingar koma fram í prófunarskýrslunni ef unnt er:

— dýrategund, stofn, uppruni, umhverfisaðstæður og fóður,

— lýsing á merktum efnum ef þau eru notuð,

— skammtastærðir og skammtabil,

— íkomuleið(ir) og öll burðarefni sem eru notuð,

— eiturhrif og önnur áhrif sem koma fram,

— aðferðir við greiningu á prófunarefni og/eða umbrotsefnum í líffræðilegum sýnum, þ.m.t. í útöndunarlofti,

— mælingar, settar upp í töflur eftir kyni, skammti, skömmtunaráætlun, tíma, vefjum og líffærum,

— frásogað og útskilið magn sem fall af tíma,

— aðferðir við lýsingu og sanngreiningu á umbrotsefnum í líffræðilegum sýnum,

— aðferðir við lífefnafræðilegar mælingar í tengslum við efnaskipti,

— líkleg efnaskiptaferli,

— umfjöllun um niðurstöðurnar,

— túlkun niðurstaðna.

3.2. MAT OG TÚLKUN

Sjá almennan inngang að B-hluta.

4. **HEIMILDIR**

Sjá almennan inngang að B-hluta.

B.37. SÍÐKOMIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM FOSFÓRLÍFRÆNNA EFNA EFTIR BRÁÐ VÁHRIF

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Þegar eiturhrif efna eru metin er áríðandi að hafa í huga getu tiltekinna efnaflokka til að valda sérstökum tegundum taugaeiturhrifa sem óvíst er að finnist í öðrum rannsóknum á eiturhrifum. Komið hefur í ljós að sum fosfórlífræn efni valda síðkomnum taugaeiturhrifum og ber að rannsaka þau með tilliti til þess.

Nota má skimunarprófanir í glasi til að sanngreina þau efni sem kunna að valda síðkomnum fjöltaugakvillum; neikvæðar niðurstöður úr rannsóknum í glasi eru þó ekki sönnun fyrir því að prófunarefnið sé ekki efni sem valdi taugaeiturhrifum.

Sjá almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Fosfórlífræn efni eru óhlaðnir, fosfórlífrænir estrar, þíóestrar og anhýdríð af fosfórlífrænum, fosfónlífrænum og fosfóramíðlífrænum sýrum eða samsvarandi fosfórþíósýrum, fosfónþíósýrum og fosfórþíóamíðsýrum eða önnur efni sem geta valdið þeim síðkomnu eiturhrifum sem koma stundum fram í þessum efnaflokki.

Síðkomin taugaeiturhrif er heilkenni sem hefur í för með sér langvarandi, síðkomið slingur, fjarlægan taugasímakvilla í mænu og úttaugum og hömlun og öldrun markesterasa taugakvilla (e. *neuropathy target esterase* (NTE)) í taugavef.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Prófa má viðmiðunarefni á jákvæðum samanburðarhópi til að sýna að við prófunaraðstæður á rannsóknarstofu hafi ekki orðið marktækar breytingar á svörun dýrategundarinnar sem er prófuð.

Dæmi um mikið notað efni sem veldur taugaeiturhrifum er trí-o-tólýlfosfat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, í CAS-flokkunarkerfinu: fosfórsýra, tris(2-metýlfenýl)estri), einnig þekkt sem tris-o-kresýlfosfat.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Varphænum, sem hafa verið varðar fyrir bráðum kólínvirkum áhrifum ef þess hefur þurft við, er gefið prófunarefnið um munn í einum skammti. Fylgst er með dýrunum í 21 dag með tilliti til afbrigðilegs atferlis, slingurs og lömunar. Gerðar eru lífefnafræðilegar mælingar, einkum á hömlun markesterasa taugakvilla, á hænum sem eru valdar af handahófi úr hverjum hópi, venjulega 24 og 48 klukkustundum eftir inngjöf. Tuttugu og einum degi eftir inngjöf eru hænurnar, sem eftir eru, aflífaðar og gerðar vefjameinafræðilegar rannsóknir á völdum taugavefjum.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Undirbúningur**

Heilbrigðar, ungar, fullvaxnar hænur, sem ganga eðlilega og eru lausar við veirusjúkdóma og lyfjagjöf sem geta truflað rannsóknina, skulu valdar af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa og látnar aðlagast aðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga áður en rannsóknin hefst.

Notuð eru búr eða hólf sem eru nógu stór til að hænurnar geti hreyft sig óhindrað og auðvelt sé að fylgjast með göngulagi þeirra.

Að jafnaði skal gefa prófunarefnið um munn og nota magaslöngu, gelatínhylki eða sambærilega aðferð. Vökva má gefa óblandaða eða uppleysta í viðeigandi burðarefni, t.d. maísolíu, en föst efni skal leysa upp ef unnt er þar eð hætta er á að upptaka stórra skammta af föstu efni í gelatínhylkjum verði ekki skilvirk. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir en að öðrum kosti skal ákvarða þá fyrir prófunina.

1.5.2. **Prófunarskilyrði**

1.5.2.1. *Tilraunadýr*

Mælt er með því að nota ungar, fullvaxnar varphænur (lat. *Gallus gallus domesticus*), 8–12 mánaða gamlar. Nota skal kyn og stofna af venjulegri stærð og hænurnar ættu að jafnaði að hafa verið aldar við þau skilyrði að geta hreyft sig óhindrað.

1.5.2.2. *Fjöldi og kyn*

Auk meðferðarhópsins skal nota bæði samanburðarhóp, sem fær eingöngu burðarefni, og jákvæðan samanburðarhóp. Samanburðarhópurinn, sem fær eingöngu burðarefni, er meðhöndlaður alveg á sama hátt og meðferðarhópurinn, að öðru leyti en því að prófunarefnið er ekki gefið.

Nota skal nægilega margar hænur í hverjum hópi svo að aflífa megi a.m.k. sex fugla til lífefnafræðilegra athugana (þrjá í einu á tveimur völdum tímapunktum) og sex fuglar geti lifað í 21 dag vegna meinafræðilegra athugana.

Hægt er að rannsaka jákvæða samanburðarhópinn samtímis eða styðjast við athuganir á nýlegum, rannsóknarsögulegum samanburðarhópi. Í honum skulu vera a.m.k. sex hænur sem fá meðferð með þekktu efni sem veldur síðkomnum taugaeiturhrifum, þrjár hænur til lífefnafræðirannsókna og þrjár til meinafræðirannsókna. Mælt er með því að rannsóknarsöguleg gögn séu uppfærð reglulega. Vinna skal upp ný, jákvæð samanburðargögn ef rannsóknarstofan, sem framkvæmir prófunina, hefur breytt þýðingarmiklum atriðum (til dæmis stofni, fóðri eða umhverfisaðstæðum).

1.5.2.3. *Skammtastærðir*

Gera skal forrannsókn með hæfilega mörgum hænum, sem skipt er í hópa sem fá mismunandi skammtastærðir, til að unnt sé að ákveða hvaða skammtastærð skuli nota í aðalrannsókninni. Í þessari forrannsókn eru einhver dauðsföll að jafnaði nauðsynleg til að hægt sé að skilgreina hæfilegan skammt fyrir aðalrannsóknina. Til þess að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra, kólínvirkra áhrifa má þó nota atrópín eða önnur verndandi efni sem vitað er að hafa ekki áhrif á síðkomna taugaeiturhrifasvörun. Nota má ýmsar prófunaraðferðir til að áætla þann hámarksskammt prófunarefna sem er ekki banvænn (sjá aðferð B.1a). Rannsóknarsöguleg gögn um hænur eða aðrar eiturefnafræðilegar upplýsingar geta einnig komið að gagni við val á skammtastærð.

Nota ber eins stóra skammta af prófunarefni og hægt er í aðalrannsókninni, að teknu tilliti til niðurstaðna úr forrannsókninni viðvíkjandi skammtaval og til efri marka skammtastærðar sem eru 2000 mg/kg líkamsþyngdar. Dauðsföll mega ekki vera fleiri en svo að nógu mörg dýr séu enn á lífi fyrir lífefnafræðirannsóknir (sex) og meinafræðirannsóknir (sex) eftir 21 dag. Nota ber atrópín eða önnur verndandi efni, sem vitað er að hafa ekki áhrif á síðkomna taugaeitursvörun, til að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra, kólínvirkra áhrifa.

1.5.2.4. *Markprófun*

Ef engin merkjanleg eituráhrif koma fram í prófun með skammtastærð, sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann rannsókn með stærri skammti að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.5.3. **Athugunartímabil**

Athugunartímabilið skal vera 21 dagur.

1.5.4. Verkferli

Eftir að verndandi efni hefur verið gefið inn til að koma í veg fyrir dauðsföll vegna bráðra, kólínvirkra áhrifa er prófunarefnið gefið inn í einum skammti.

Almennar athuganir

Athuganir skulu hefjast strax að loknum váhrifum. Skoða skal allar hænurnar vandlega mörgum sinnum fyrstu tvo dagana og a.m.k. einu sinni á dag eftir það í 21 dag eða þangað til þær eru aflífaðar samkvæmt áætlun. Skrá skal öll merki um eiturhrif, þar á meðal afbrigðilegt atferli, hvenær það hefst, hvers eðlis það er, hversu alvarlegt það er og hve lengi það varir. Mæla skal slingur eftir raðkvarða, sem skiptist í a.m.k. fjögur stig, og skrá skal lömunareinkenni. Hænur, sem eru valdar til meinafræðilegra rannsókna, skulu teknar úr búrunum a.m.k. tvisvar í viku og látnar erfiða um tíma, t.d. klifra í stiga, til að auðveldara sé að koma auga á lítilsháttar eiturhrif. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikla þjáningu eða sársauka, skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

Líkamsþyngd

Vigta skal allar hænurnar rétt áður en þeim er gefið prófunarefnið og a.m.k. vikulega eftir það.

Lífefnafræði

Velja skal sex hænur af handahófi úr hverjum meðferðarhópi og samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni og þrjár úr jákvæða samanburðarhópnum (þegar sá hópur er rannsakaður samtímis), aflífa þær fáeinum dögum eftir inngjöf og undirbúa og rannsaka heilann og lendahluta mænunnar með tilliti til hömlunar markesterasa taugakvilla. Að auki kann að vera gagnlegt að undirbúa og rannsaka settaugavef með tilliti til hömlunar markesterasa taugakvilla. Venjulega eru þrjár hænur úr samanburðarhópnum og þrjár úr hverjum meðferðarhóp aflífaðar eftir 24 klukkustundir og þrjár eftir 48 klukkustundir en þrjár hænur úr jákvæðu samanburðarhópunum eru aflífaðar eftir 24 klukkustundir. Ef athugun á klínískum ummerkjum um eitrun (það má oft meta með því að athuga hvenær merki um kólínvirkni koma fram) bendir til þess að eitrunarefnið skiljist mjög hægt út getur verið betra að taka vefjasýni í tvö skipti úr þremur fuglum á tímabilinu frá 24 klukkustundum og upp í 72 klukkustundir eftir inngjöf.

Ef það er talið heppilegt má einnig framkvæma greiningu með tilliti til asetýlkólínkljúfs (AChE) í þessum sýnum. Asetýlkólínkljúfur getur þó sjálfkrafa orðið virkur aftur í lífi og það getur leitt til vanmats á getu prófunarefnisins til að hamla virkni asetýlkólínkljúfs.

Stórsæ krufning

Stórsæ krufning á öllum dýrum (sem eru aflífuð samkvæmt áætlun eða þegar þau eru dauðvona) skal fela í sér athugun á útliti heilans og mænunnar.

Vefjameinafræðileg rannsókn

Rannsaka skal, í smásjá, taugavef úr dýrum sem lifa af athugunartímabilið og eru ekki notuð í lífefnafræðilegar rannsóknir. Vefirnir eru steyptir á staðnum með gegnflæðiaðferð. Sýnin skulu tekin úr litla heila (langsnið eftir miðju), mænukylfu, mænu og úttaugum. Sýnin úr mænunni skulu tekin við efri hálsliði, mið-brjósthrygg og á mjóhryggjar-spjaldhryggjarsvæðinu. Taka skal sýni af fjarlægari hluta sköflungstaugarinnar og greinum hennar yfir í vöðva kálfans og úr settauginni. Sýnin eru lituð með sérstökum litum fyrir mýli og taugasíma.

2. **GÖGN**

Ef neikvæður niðurstöður fást varðandi endapunktana sem eru valdir í þessari aðferð (lífefnafræði, vefjameinafræði og athugun á atferli) er að jafnaði ekki ástæða til frekari prófana á síðkomnum eiturhrifum. Óvissar eða ófullnægjandi niðurstöður varðandi þessa endapunkta geta gefið tilefni til frekari kannana.

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra með vefjaskemmdir eða merki um atferlisleg eða lífefnafræðileg áhrif, tegund og alvarleikastig þessara vefjaskemmda eða áhrifa og hundraðshluti dýra með hverja tegund og hvert stig vefjaskemmda eða áhrifa.

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli tíðni, alvarleikastigs og fylgni atferlislegra, lífefnafræðilegra og vefjameinafræðilegra áhrifa og allra annarra áhrifa sem koma í ljós í meðferðar- og samanburðarhópunum.

Meta skal tölulegar niðurstöður með heppilegum og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum. Velja skal tölfræðiaðferðir á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

3.1. Tilraunadýr:

— stofninn sem er notaður,

— fjöldi og aldur dýranna,

— uppruni, aðbúnaður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

3.2. Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um undirbúning, stöðugleika og einsleitni prófunarefnisins, eftir því sem við á,

— rök fyrir vali á burðarefni,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um gefna skammta, þar á meðal upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem er gefið,

— auðkenni verndarefnis, ef um slíkt er að ræða, og upplýsingar um hvernig það er gefið.

3.3. Niðurstöður:

— upplýsingar um líkamsþyngd,

— gögn um eiturefnasvörun í hverjum hópi, þ.m.t. dánartala,

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— ítarleg lýsing á lífefnafræðilegum aðferðum og niðurstöðum,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

Þessi aðferð samsvarar OECD-viðmiðunarreglu 418 um prófanir.

B.38. SÍÐKOMIN TAUGAEITURHRIF AF VÖLDUM FOSFÓRLÍFRÆNNA EFNA Í 28 DAGA RANNSÓKN MEÐ ENDURTEKNUM SKÖMMTUM

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Þegar eiturhrif efna eru metin er áríðandi að hafa í huga getu tiltekinna efnaflokka til að valda sérstökum tegundum taugaeiturhrifa sem óvíst er að finnist í öðrum rannsóknum á eiturhrifum. Komið hefur í ljós að sum fosfórlífræn efni valda síðkomnum taugaeiturhrifum og ber að rannsaka þau með tilliti til þess.

Nota má skimunarprófanir í glasi til að sanngreina þau efni sem kunna að valda síðkomnum fjöltaugakvillum; neikvæðar niðurstöður úr rannsóknum í glasi eru þó ekki sönnun fyrir því að prófunarefnið sé ekki efni sem valdi taugaeiturhrifum.

Í þessari 28 daga rannsókn á síðkomnum taugaeiturhrifum fást upplýsingar um hugsanlegar heilbrigðishættur vegna endurtekinna váhrifa í takmarkaðan tíma. Í rannsókninni fást upplýsingar um tengslin milli skammts og svörunar og með henni er hægt að áætla mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (NOAEL) sem má nota til að fastsetja öryggisviðmiðanir varðandi váhrif.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Fosfórlífræn efni eru óhlaðnir, fosfórlífrænir estrar, þíóestrar og anhýdríð af fosfórlífrænum, fosfónlífrænum og fosfóramíðlífrænum sýrum eða samsvarandi fosfórþíósýrum, fosfónþíósýrum og fosfórþíóamíðsýrum eða önnur efni sem geta valdið þeim síðkomnu eiturhrifum sem stundum koma fram í þessum efnaflokki.

Síðkomin taugaeiturhrif er heilkenni sem hefur í för með sér langvarandi, síðkomið slingur, fjarlægan taugasímakvilla í mænu og úttaugum og hömlun og öldrun markesterasa taugakvilla (e. *neuropathy target esterase* (NTE)) í taugavef.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Hænum eru gefnir daglegir skammtar af prófunarefninu um munn í 28 daga. Dýrin eru skoðuð a.m.k. einu sinni á dag í 14 daga eftir síðasta skammt með tilliti til afbrigðilegs atferlis, slingurs og lömunar. Gerðar eru lífefnafræðilegar mælingar, einkum á hömlun markesterasa taugakvilla (NTE), á hænum sem eru valdar af handahófi úr hverjum hópi, venjulega 24 og 48 klukkustundum eftir síðustu inngjöf. Þegar liðnar eru tvær vikur frá síðasta skammti eru hænurnar, sem eftir eru, aflífaðar og gerðar vefjameinafræðilegar rannsóknir á völdum taugavefjum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

Heilbrigðar, ungar, fullvaxnar hænur, sem ganga eðlilega og eru lausar við veirusjúkdóma og lyfjagjöf sem geta truflað rannsóknina, skulu valdar af handahófi og skipað í meðferðar- og samanburðarhópa og látnar aðlagast aðstæðum á rannsóknarstofunni í a.m.k. fimm daga áður en rannsóknin hefst.

Notuð eru búr eða hólf sem eru nógu stór til að hænurnar geti hreyft sig óhindrað og auðvelt sé að fylgjast með göngulagi þeirra.

Gefa skal prófunarefnið um munn á hverjum degi 7 daga í viku, helst með magaslöngu eða í gelatínhylkjum. Vökva má gefa óblandaða eða uppleysta í viðeigandi burðarefni, t.d. maísolíu, en föst efni skal leysa upp ef unnt er þar eð hætta er á að upptaka stórra skammta af föstu efni í gelatínhylkjum verði ekki skilvirk. Ef vatnslaus burðarefni eru notuð skulu eitureiginleikar þeirra vera þekktir en að öðrum kosti skal ákvarða þá fyrir prófunina.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Tilraunadýr*

Mælt er með því að nota ungar, fullvaxnar varphænur (lat. *Gallus gallus domesticus*), 8–12 mánaða gamlar. Nota skal kyn og stofna af venjulegri stærð og hænurnar ættu að jafnaði að hafa verið aldar við þau skilyrði að geta hreyft sig óhindrað.

1.4.2.2. *Fjöldi og kyn*

Að jafnaði skal nota a.m.k. þrjá meðferðarhópa og samanburðarhóp sem fær eingöngu burðarefni. Samanburðarhópurinn, sem fær eingöngu burðarefni, er meðhöndlaður alveg á sama hátt og meðferðarhópurinn að öðru leyti en því að prófunarefnið er ekki gefið.

Nota skal nægilega margar hænur í hverjum hópi svo að aflífa megi a.m.k. sex fugla til lífefnafræðilegra athugana (þrjá í einu á tveimur völdum tímapunktum) og sex fuglar geti lifað í 14 daga eftir meðferð vegna meinafræðilegra rannsókna.

1.4.2.3. *Skammtastærðir*

Velja skal skammtastærðir með tilliti til niðurstaðna úr prófun á síðkomnum taugaeiturhrifum eftir bráð váhrif og annarra gagna sem eru til um eiturhrif og eiturefnahvörf prófunarefnisins. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann valdi eiturhrifum, helst síðkomnum taugaeiturhrifum, en ekki dauða eða greinilegum þjáningum. Eftir það er valin röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð.

1.4.2.4. *Markprófun*

Ef engin merkjanleg eituráhrif koma fram í prófun með skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann rannsókn með stærri skammti að teljast ónauðsynleg. Markprófunin gildir nema þegar líkleg váhrif á menn benda til þess að nota þurfi stærri skammt.

1.4.2.5. *Athugunartímabil*

Athuga skal öll dýrin a.m.k. daglega á váhrifatímabilinu og í 14 daga eftir það nema krufning sé fyrirhuguð.

1.4.3. Verkferli

Dýrunum er gefið prófunarefnið sjö daga í viku í 28 daga.

Almennar athuganir

Athuganir skulu hefjast strax eftir að meðferð hefst. Skoða skal allar hænurnar vandlega a.m.k. einu sinni á dag þá 28 daga sem meðferðin stendur og í 14 daga eftir það eða þangað til þær eru aflífaðar samkvæmt áætlun. Skrá skal öll merki um eiturhrif, þ.m.t. upphafstíma þeirra, eðli, alvarleika og tímalengd. Athuganir skulu ná til afbrigðilegs atferlis, en ekki einskorðast við það. Mæla skal slingur eftir raðkvarða, sem skiptist í a.m.k. fjögur stig, og skrá lömunareinkenni. Hænurnar skulu teknar úr búrunum a.m.k. tvisvar í viku og látnar erfiða um tíma, til dæmis klifra í stiga, til að auðveldara sé að koma auga á lítilsháttar eiturhrif. Dauðvona dýr og dýr, sem sýna merki um mikla þjáningu eða sársauka, skal fjarlægja strax og eftir þeim er tekið, aflífa þau á mannúðlegan hátt og kryfja.

Líkamsþyngd

Vigta skal allar hænurnar rétt áður en þeim er gefið prófunarefnið í fyrsta sinn og a.m.k. vikulega eftir það.

Lífefnafræði

Velja skal sex hænur af handahófi úr hverjum meðferðarhópi og samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni, aflífa þær fáeinum dögum eftir síðasta skammt og undirbúa og rannsaka heilann og lendahluta mænunnar með tilliti til hömlunar markesterasa taugakvilla (e. *neuropathy target esterase*). Að auki kann

að vera nauðsynlegt að undirbúa og rannsaka hömlun markesterasa taugakvilla í settaugavef. Venjulega eru þrjár hænur úr samanburðarhópnum og þrjár úr hverjum meðferðarhópi aflífaðar eftir 24 klukkustundir og þrjár 48 klukkustundum eftir síðasta skammt. Ef gögn úr rannsókninni á bráðum eiturhrifum eða öðrum rannsóknum (til dæmis rannsókn á eiturefnahvörfum) benda til þess að betra sé að aflífa fuglana á öðrum tímum eftir síðasta skammt skal gera það og skrá ástæðurnar fyrir því.

Ef það er talið heppilegt má einnig framkvæma greiningu með tilliti til asetýlkólínkljúfs (AChE) í þessum sýnum. Asetýlkólínkljúfur getur þó sjálfkrafa orðið virkur aftur í lífi og það getur leitt til vanmats á getu prófunarefnisins til að hamla virkni asetýlkólínkljúfs.

Stórsæ krufning

Stórsæ krufning á öllum dýrum (sem eru aflífuð samkvæmt áætlun eða þegar þau eru dauðvona) skal fela í sér athugun á útliti heilans og mænunnar.

Vefjameinafræðileg rannsókn

Rannsaka skal, í smásjá, taugavef úr dýrum sem lifa af athugunartímabilið og eru ekki notuð í lífefnafræðilegar rannsóknir. Vefirnir eru steyptir á staðnum með gegnflæðiaðferð. Sýnin skulu tekin úr litla heila (langsnið eftir miðju), mænukylfu, mænu og úttaugum. Sýnin úr mænunni skulu tekin við efri hálsliði, mið-brjósthrygg og á mjóhryggjar-spjaldhryggjarsvæðinu. Taka skal sýni af fjarlægari hluta sköflungstaugarinnar og greinum hennar yfir í vöðva kálfans og úr settauginni. Sýnin eru lituð með sérstökum litum fyrir mýli og taugasíma. Í upphafi skal gera smásjárrannsókn á varðveittum vefjum úr öllum dýrum í samanburðarhópnum og í hópnum sem fær stærsta skammtinn. Þegar merki koma fram um áhrif í hópnum sem fær stærsta skammtinn skal einnig fara fram smásjárrannsókn á hænum í hópunum sem fá meðalstóran og lítinn skammt.

2. **GÖGN**

Ef neikvæður niðurstöður fást varðandi endapunktana sem eru valdir í þessari aðferð (lífefnafræði, vefjameinafræði og athugun á atferli) er að jafnaði ekki ástæða til frekari prófana á síðkomnum eiturhrifum. Óvissar eða ófullnægjandi niðurstöður varðandi þessa endapunkta geta gefið tilefni til frekari kannana.

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra með vefjaskemmdir eða merki um atferlisleg eða lífefnafræðileg áhrif, tegund og alvarleikastig þessara vefjaskemmda eða áhrifa og hundraðshluti dýra með hverja tegund og hvert stig vefjaskemmda eða áhrifa.

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli tíðni, stigs og fylgni atferlislegra, lífefnafræðilegra og vefjameinafræðilegra áhrifa og allra annarra áhrifa sem koma í ljós í hverjum meðferðar- og samanburðarhópi.

Meta skal tölulegar niðurstöður með heppilegum og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum. Velja skal tölfræðiaðferðir á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

3.1. Tilraunadýr:

— stofninn sem er notaður,

— fjöldi og aldur dýranna,

— uppruni, aðbúnaður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

3.2. Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um undirbúning, stöðugleika og einsleitni prófunarefnisins, eftir því sem við á,

— rök fyrir vali á burðarefni,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um gefna skammta, þar á meðal upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem gefið er,

— rök fyrir því að velja aðra tíma fyrir lífefnafræðilegar ákvarðanir en eftir 24 og 48 klukkustundir.

3.3. Niðurstöður:

— upplýsingar um líkamsþyngd,

— gögn um eiturefnasvörun eftir skammtastærðum, þ.m.t. dánartala,

— mörk um engin merkjanleg, skaðleg, áhrif,

— eðli þeirra atriða sem koma fram við klíníska athugun, alvarleiki þeirra og varanleiki (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— ítarleg lýsing á lífefnafræðilegum aðferðum og niðurstöðum,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum vefjameinafræðilegum niðurstöðum,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

Þessi aðferð samsvarar OECD-viðmiðunarreglu 419 um prófanir.

B.39. PRÓFUN Í LÍFI Á ÓFYRIRSÉÐRI DNA-NÝMYNDUN Í LIFRARFRUMUM SPENDÝRA

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 486 um prófanir: prófun í lífi á ófyrirséðri DNA-nýmyndun í lifrarfrumum spendýra (1997).

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með prófun í lífi á ófyrirséðri DNA-nýmyndun í lifrarfrumum spendýra er að finna prófunarefni sem virkja viðgerðir á DNA í lifrarfrumum meðhöndlaðra dýra (sjá 1.–4. heimild).

Þessi prófun í lífi er aðferð til að rannsaka erfðaeiturhrif íðefna í lifur. Mældi endapunkturinn gefur vísbendingu um DNA-skemmdir og tilheyrandi viðgerð í lifrarfrumum. Efnaskipti frásogaðra efna eiga sér fyrst og fremst stað í lifrinni. Þetta líffæri er því kjörið til mælinga á DNA-skemmdum í lífi.

Ef vísbendingar eru um að prófunarefnið nái ekki til markvefjarins hentar þessi prófun ekki.

Endapunktur ófyrirséðrar DNA-nýmyndunar er mældur með því að ákvarða upptöku merktra kirnisleifa í frumum þar sem reglubundinn DNA-nýmyndun (í S-fasa) á sér ekki stað. Sú aðferð, sem er mest notuð, er ákvörðun á upptöku þrívetnismerkts týmidíns (^{3}H-TdR) með hjálp eigingeislunarmyndatöku. Prófanir í lífi á ófyrirséðri DNA-nýmyndun eru einkum gerðar á lifur úr rottum. Nota má aðra vefi en lifrarvef en þessi aðferð tekur ekki til þeirra.

Greining á svörun í prófun á ófyrirséðri DNA-nýmyndun er háð því hversu margir DNA-basar eru skornir frá og aðrir koma í staðinn á þeim stað þar sem skemmdin er. Prófun á ófyrirséðri DNA-nýmyndun er því sérstaklega gagnleg til að greina „fjölbasaviðgerð“ (20–30 basar að lengd) sem tiltekin efni virkja. Til að greina „fábasaviðgerð“ (1–3 basar) þarf á hinn bóginn mun minna næmi. Af þessu geta enn fremur hlotist stökkbreytingar vegna þess að viðgerð á DNA-skemmdum verður ekki eða viðgerðin mistekst eða eftirmyndun eftir DNA-skemmdinni verður röng. Það hversu mikil svörunin verður í prófuninni á ófyrirséðri DNA-nýmyndun segir ekkert til um gæði viðgerðarferlisins. Auk þessa er hugsanlegt að stökkbreytivaldur hvarfist við DNA og að skemmdin í DNA verði ekki lagfærð með skurðviðgerð. Á móti þeirri staðreynd, að prófunin á ófyrirséðri DNA-nýmyndun veitir engar sértækar upplýsingar um stökkbreytandi virkni, kemur að þessi endapunktur getur haft mikið næmi vegna þess að hann er mældur í öllu genamenginu.

Sjá einnig almennan inngang að B-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Frumur í viðgerð: nettófjöldi korna í kjarna (e. NNG (*net nuclear grain*)) sem er meiri en fyrirframákveðið gildi sem rannsóknarstofan, þar sem prófunin fer fram, skal rökstyðja.

Nettófjöldi korna í kjarna (e. NNG): megindlegur mælikvarði á virkni ófyrirséðrar DNA-nýmyndunar í frumum í prófunum á ófyrirséðri DNA-nýmyndun með eigingeislunarmyndatöku, reiknaður með því að draga meðalfjölda umfrymiskorna á svæðum í umfrymi, sem jafngilda kjarnasvæðum (e. CG (*cytoplasmic grains*)), frá fjölda korna í kjarna (e. NG (*nuclear grains*)): NNG = NG – CG. Nettófjöldi korna í kjarna er reiknaður fyrir hverja frumu og síðan tekinn saman fyrir frumur í rækt, samhliða ræktum o.s.frv.

Ófyrirséð DNA-nýmyndun (e. UDS (*unscheduled DNA Synthesis*)): viðgerðarnýmyndun á DNA eftir að DNA-bútur með skemmd, sem hefur verið kölluð fram með íðefnum eða eðlisfræðilegum þáttum, hefur verið skorinn frá og fjarlægður.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunin í lífi á ófyrirséðri DNA-nýmyndun í lifrarfrumum sýnir viðgerðarnýmyndun á DNA eftir að DNA-bútur með svæði með skemmd, sem hefur verið kölluð fram með íðefnum eða eðlisfræðilegum þáttum, hefur verið skorinn frá og fjarlægður. Prófunin byggist venjulega á upptöku ^{3}H-TdR í DNA í lifrarfrumum með hlutfallslega fáum frumum í S-fasa frumuhringsins. Upptaka ^{3}H-TdR er venjulega ákvörðuð með eigingeislunarmyndatöku þar eð þessi aðferð er ekki jafnnæm fyrir truflun frá frumum í S-fasa og t.d. sindurtalning í vökva.

1.4. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Val á dýrategund*

Algengt er að nota rottur en einnig má nota aðrar heppilegar tegundir spendýra. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna að vera í lágmarki og ekki víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig.

1.4.1.2. *Aðbúnaður og fóðrun*

Almennu skilyrðin, sem eru tilgreind í almenna inngangínum að B-hluta, gilda en þó ætti að leitast við að halda rakanum við 50–60%.

1.4.1.3. *Undirbúningur dýra*

Heilbrigðum, ungum, fullvöxnum dýrum er slembiraðað í samanburðar- og meðferðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að láta þau venjast umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.1.4. *Undirbúningur prófunarefnis*

Prófunarefni í föstu formi skulu leyst upp eða útbúin úr þeim svifblanda í viðeigandi leysum eða burðarefnum og, ef við á, þynnt áður en þau eru gefin dýrunum. Gefa má dýrunum fljótandi prófunarefni óblönduð eða þynnt. Nota skal ferskar blöndur af prófunarefni nema gögn um stöðugleika staðfesti að efnið þoli geymslu.

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Leysir/burðarefni*

Leysirinn eða burðarefnið skal ekki valda eiturhrifum við þær skammtastærðir sem eru notaðar og vissa skal vera fyrir því að efnin hvarfist ekki við prófunarefnið. Ef notaður er lítt þekktur leysir eða burðarefni skal notkunin studd gögnum sem staðfesta samhæfi þeirra. Mælst er til þess, verði því við komið, að fyrst sé kannað hvort nota megi vatnskenndan leysi eða burðarefni.

1.4.2.2. *Samanburðarhópar*

Í hverjum hluta tilraunarinnar, sem er gerður óháður hinum hlutum hennar, skulu vera samskeiða, jákvæðir og neikvæðir (leysir eða burðarefni) samanburðarhópar. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu.

Við jákvæða samanburðinn skal nota efni sem vitað er að kalla fram ófyrirséða DNA-nýmyndun þegar þau eru gefin í váhrifastyrk sem vænst er að valdi greinanlegri aukningu umfram það sem gerist við bakgrunnsgildi. Þegar um er að ræða jákvæð samanburðarefni sem útheimta efnaskiptavirkjun skal nota skammtastærðir sem kalla fram hófstillta svörun (4. heimild). Velja má þannig skammta að áhrifin verði skýr en þó þannig að sá sem les af geti ekki strax sanngreint kóðuðu sýnisglerin. Hér á eftir eru nokkur dæmi um efni sem eru notuð við jákvæðan samanburð:

Sýnatökutími	Efni	CAS-nr.	EINECS-nr.
Snemma (2–4 klst.)	N-nítrósódímetýlamín	62-75-9	200-249-8
Seint (12–16 klst.)	N-2-flúorenýlasetamíð (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Nota má önnur viðeigandi efni við jákvæðan samanburð. Það er ásættanlegt að íkomuleið í jákvæða samanburðinum sé önnur en sú sem er notuð fyrir prófunarefnið.

1.5. VERKFERLI

1.5.1. **Fjöldi og kyn dýra**

Dýrin skulu vera nægilega mörg til að unnt sé að taka tillit til eðlilegra, líffræðilegra frávika í svörun í prófuninni. Í hverjum hópi skulu vera a.m.k. þrjú greiningartæk dýr. Ef umfangsmikill, rannsóknarsögulegur gagnagrunnur hefur verið byggður upp þarf aðeins eitt eða tvö dýr í samskeiða, neikvæðu og jákvæðu samanburðarhópana.

Ef gögn liggja fyrir, þegar rannsóknin er gerð, úr rannsóknum á sömu dýrategund og með sömu váhrifaleið og gögnin sýna að enginn umtalsverður munur er á eiturhrifum hjá mismunandi kynjum þá nægir að prófunin fari fram á dýrum af öðru kyninu og þá skal fremur velja karldýr. Ef váhrif á menn frá íðefnum eru hugsanlega kynbundin, eins og raunin er með sum lyfjaefni, skal prófunin fara fram á því kyni dýrsins sem við á hverju sinni.

1.5.2. **Meðferðaráætlun**

Prófunarefnin eru yfirleitt gefin í einni meðferð.

1.5.3. **Skammtastærðir**

Að jafnaði eru notaðar a.m.k. tvær skammtastærðir. Stærsti skammturinn er skilgreindur sem sá skammtur sem kallar fram þannig merki um eiturhrif að búast megi við því, miðað við óbreytta skömmtunaráætlun, að stærri skammtar valdi dauða. Að jafnaði skal minni skammturinn vera 50–25% af stærsta skammtinum.

Gera má undantekningar frá viðmiðunum fyrir ákvörðun skammta þegar um er að ræða efni sem hafa sérhæfða lífvirkni í litlum skömmtum sem kalla ekki fram eiturhrif (t.d. hormón og jafnskiptingarræsar) og þau skulu metin hvert um sig. Ef engin nothæf gögn liggja fyrir og framkvæma þarf skammtastærðarrannsókn skal hún fara fram á sömu rannsóknarstofu og með sömu tegund, stofni og kyni tilraunadýrs og í meginrannsókninni og meðferðaráætlunin skal vera hin sama í báðum tilvikum.

Einnig má skilgreina stærsta skammt sem þann skammt sem kallar fram einhver merki um eiturhrif í lifur (t.d. korpukjarna).

1.5.4. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg eiturhrif koma fram í prófun með skammti sem er a.m.k. 2000 mg/kg líkamsþyngdar og gefinn í einum áfanga eða í tveimur áföngum á einum degi og ef erfðaeiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efni sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn að vera ónauðsynleg. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta í markprófuninni.

1.5.5. **Gjöf skammta**

Dýrunum er yfirleitt gefið prófunarefnið í maga með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Gefa má efnið eftir öðrum leiðum en þá skal það stutt rökum. Ekki er mælt með því að efninu sé sprautað í kviðarhol þar eð þá getur efnið komist beint í snertingu við lifrina en berst ekki með blóðrásinni. Það ræðst af stærð tilraunadýrsins hve mikinn vökva hægt er að gefa í einu með magaslöngu eða innsprautun. Rúmmálið skal ekki vera meira en 2 ml/100 g líkamsþyngdar. Færa skal rök fyrir því ef rúmmálið er meira en þetta. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

1.5.6. **Undirbúningur lifrarfrumna**

Lifrarfrumur eru venjulega teknar úr dýrum, sem hafa fengið meðferð, og undirbúnar 12–16 klukkustundum eftir að efnið var gefið. Venjulega er þörf fyrir aðra sýnatöku snemma (að jafnaði tveimur til fjórum klukkustundum eftir meðferð) nema fram komi skýr, jákvæð svörun eftir 12–16 klukkustundir. Taka má sýni á öðrum tímum ef gögn um eiturefnahvörf styðja það.

Skammtímaræktir með lifrarfrumum úr spendýri eru venjulega fengnar með því að láta kollagenasa flæða gegnum æðakerfi lifrar á staðnum og láta lifrarfrumur, sem hafa nýlega losnað hver frá annarri, festast á heppilegan flöt. Lífvænleiki (5. heimild) lifrarfrumna úr dýrum í neikvæðum samanburðarhópi skal vera a.m.k. 50%.

1.5.7. **Ákvörðun ófyrirséðrar DNA-nýmyndunar**

Nýlega einangraðar lifrarfrumur spendýrs eru ræktaðar hæfilega lengi, t.d. í 3–8 klukkustundir, venjulega í æti sem inniheldur ^{3}H-TdR. Þegar ræktun lýkur skal fjarlægja ætið frá frumunum og þær má síðan rækta í æti sem inniheldur ofgnótt ómerkts týmidíns til að minnka óupptekna geislavirkni („kaldhreinsun“ (e. *cold chase*)). Frumurnar eru síðan hreinsaðar, festar og þurrkaðar. Ef frumurnar eru ræktaðar lengur en þetta þarf e.t.v. ekki að beita kaldhreinsun. Sýnisglerjum er dýft í ljósnæmilag til eigingeislunarmyndatöku (e. *autoradiographic emulsion*) og því næst látin standa í myrkri (t.d. í kæli í 7–14 daga) og síðan eru þau framkölluð og lituð og silfurkornin talin. Tvö eða þrjú sýnisgler eru útbúin fyrir hvert dýr.

1.5.8. **Greining**

Á sýnisglerjunum skulu vera nógu margar frumur, sem eru eðlilegar að formgerð, til að unnt sé að meta ófyrirséða DNA-nýmyndun á marktækan hátt. Sýnin eru skoðuð í smásjá og leitað að augljósum merkjum um frumueiturhrif (sem eru t.d. korpukjarni eða lítil geislamerking).

Sýnisgler skulu kóðuð áður en talning korna hefst. Að jafnaði eru 100 frumur á a.m.k. tveimur sýnisglerjum metnar úr hverju dýri; færa þarf rök fyrir því ef færri en 100 frumur á hvert dýr eru metnar. Við talningu á kornum eru kjarnar í S-fasa ekki metnir en skrá má hlutfall frumna í S-fasa.

Nota skal heppilegar aðferðir til að ákvarða upptöku, sem kemur fram sem útfelling silfurkorna, á ^{3}H-TdR í kjarna og umfrymi frumna sem eru eðlilegar að formgerð.

Kornatala er ákvörðuð í kjarnanum (kjarnakorn (e. *nuclear grains*, (NG)) og á kjarnajafngildum svæðum í umfryminu (umfrymiskorn (e. *cytoplasmic grains* (CG)). Umfrymiskornatala er mæld annaðhvort með því að taka mest merkta svæðið í umfrymi eða með því að taka meðaltal af tveimur til þremur slembivöldum umfrymiskornatölum við hlið kjarnans. Nota má aðrar talningaraðferðir (t.d. talningu á heilum frumum) ef hægt er að rökstyðja notkun þeirra (6. heimild).

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Leggja skal fram gögn um hvert einstakt sýnisgler og dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu. Nettófjöldi korna í kjarna (NGG) skal reiknaður fyrir hverja frumu, hvert dýr og hvern skammt og fyrir hvert skipti með því að draga fjölda umfrymiskorna (CG) frá fjölda kjarnakorna (NG). Ef „frumur í viðgerð“ eru taldar skal rökstyðja viðmiðanirnar sem eru notaðar til að skilgreina „frumur í viðgerð“ og grundvalla þær á rannsóknarsögulegum gögnum eða gögnum úr samskeiða, neikvæða samanburðinum. Tölulegar niðurstöður má meta með tölfræðilegum aðferðum. Ef tölfræðilegar prófanir eru notaðar skal velja þær áður en rannsóknin er gerð og rökstyðja valið.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Dæmi um viðmiðanir fyrir jákvæða/neikvæða svörun eru m.a.:

jákvæð svörun:
i. gildi fyrir nettófjölda korna í kjarna (NNG-gildi) sem eru yfir fyrir-framákveðnum viðmiðunarmörkum en þau mörk skulu rökstudd á grundvelli rannsóknarsögulegra gagna rannsóknarstofunnar, eða

ii. gildi fyrir nettófjölda korna í kjarna sem eru marktækt hærri en samskeiða samanburðurinn,

neikvæð svörun:
i. gildi fyrir nettófjölda korna í kjarna sem eru innan við/undir rannsóknar-sögulegum viðmiðunarmörkum, eða

ii. gildi fyrir nettófjölda korna í kjarna sem eru ekki marktækt hærri en samskeiða samanburðurinn.

Meta skal líffræðilegt mikilvægi gagna: þ.e. taka þarf tillit til áhrifaþátta á borð við breytileika milli dýra, tengsla milli skammts og svörunar og frumueiturhrifa. Beita má tölfræðilegum aðferðum til að auðvelda mat á prófunarniðurstöðum. Tölfræðileg marktækni skal þó ekki vera eini þátturinn sem sker úr um það hvort svörun telst jákvæð.

Þótt niðurstöður úr flestum tilraunum séu annaðhvort ótvírætt jákvæðar eða neikvæðar gefa gögnin í örfáum tilvikum ekki kost á afdráttarlausum úrskurði um virkni prófunarefnisins. Niðurstöðurnar geta verið óvissar eða vafasamar hversu oft sem tilraunin er endurtekin.

Jákvæðar niðurstöður úr prófun í lífi á ófyrirséðri DNA-nýmyndun í lifrarfrumum spendýra benda til þess að prófunarefnið kalli fram skemmdir á DNA í lifrarfrumum spendýra í lífi sem gera má við með ófyrirséðri DNA-nýmyndun í glasi. Neikvæðar niðurstöður benda til þess að við prófunarskilyrðin kalli prófunarefnið ekki fram DNA-skemmdir sem unnt er að greina í þessari prófun.

Fjalla skal um líkindi þess að prófunarefnið nái til almennu blóðrásarinnar og þó einkum markvefjarins (t.d. altæk eiturhrif).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Leysir/burðarefni:

— rök fyrir vali á burðarefni,

— leysni og stöðugleiki prófunarefnisins í leysinum eða burðarefninu, liggi þær upplýsingar fyrir.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar, þ.m.t. dreifisvið líkamsþyngdar, meðalþyngd og staðalfrávik líkamsþyngdar fyrir hvern hóp.

Prófunarskilyrði:

— jákvæður samanburður og neikvæður (burðarefni/leysir),

— gögn úr skammtastærðarrannsókn hafi hún verið gerð,

— rök fyrir vali á skammtastærðum,

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— rökstuðningur fyrir vali á íkomuleið,

— aðferðir til að sannreyna að prófunarefnið nái út í blóðrásina eða markvefinn, ef við á,

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns,

— ítarleg lýsing á áætlunum um meðferð og sýnatöku,

— aðferðir við mælingar á eiturhrifum,

— aðferð sem er notuð við undirbúning og ræktun lifrarfrumna,

— tæknin til eigingeislunarmyndatöku (e. *autoradiographic technique*) sem er notuð,

— fjöldi útbúinna sýnisglerja og fjöldi frumna sem voru metnar,

— viðmiðanir við mat,

— viðmiðanir til að meta hvort niðurstöður rannsókna séu jákvæðar, neikvæðar eða óvissar.

Niðurstöður:

— meðalgildi fyrir kjarnakorn, umfrymiskorn og nettófjölda korna í kjarna fyrir hvert sýnisgler, hvert dýr og hvern hóp,

— tengsl milli skammts og svörunar, ef þau liggja fyrir,

— tölfræðilegt mat, ef um það er að ræða,

— merki um eiturhrif,

— gögn um samskeiða, neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan (leysir eða burðarefni) og jákvæðan samanburð, ásamt tilgreiningu á dreifisviðum, meðaltölum og staðalfráviki,

— fjöldi „frumna í viðgerð“, ef hann er ákvarðaður,

— fjöldi frumna í S-fasa, ef hann er ákvarðaður,

— lífvænleiki frumnanna.

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and Penman, M.G., (1985) An Assessment of the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, bls. 1-18.

2) Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G., (1987) A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, bls. 123-133.

3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G., (1993) In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, bls. 52-77.

4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H., (1993) Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo. Mutation Res., 312, bls. 263-285.

5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C., (1993) Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, bls. 21-27.

6) Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E., (1982) Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, bls. 553-562.

B.40. RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: MÆLING Á RAFVIÐNÁMI GEGNUM HÚÐ (e. *TER*)

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 430 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Með húðætingu er átt við varanlega vefjaskemmd í húð eftir að prófunarefni hefur verið borið á hana (samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar og merkingar á efnum og efnablöndum (GHS)) (1. heimild). Þessi aðferð byggist á verkferli þar sem ekki eru notuð lifandi dýr við mat á ætandi eiginleikum.

Mat á húðætingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (2. heimild). Komið hefur verið til móts við áhyggjur af sársauka og þjáningum dýra, sem notuð hafa verið í þessu verkferli, með því að endurskoða prófunaraðferð B.4 til að gera það kleift að ákvarða húðætingu með staðgönguaðferðum í glasi svo að komist verði hjá því að valda dýrum sársauka og þjáningum.

Fyrsta skrefið í átt að skilgreiningu á staðgönguaðferðum, sem hægt væri að nota fyrir prófanir í eftirlitsskyni á húðætingu, var að framkvæma forfullgildingarrannsókn (3. heimild). Eftir það var gerð formleg fullgildingarrannsókn (6.–8. heimild) á aðferðum með prófun í glasi til að meta húðætingu (4.–5. heimild). Niðurstöður þessara rannsókna og annarra birtra skrifa varð til þess að mælt var með því að eftirfarandi prófanir yrðu notaðar við mat í glasi á húðætingu (9.–11. heimild): prófun með líkani af mannshúð (sjá prófunaraðferð B.40a) og prófun á rafviðnámi gegnum húð (þessi aðferð).

Fullgildingarrannsókn og aðrar birtar rannsóknir hafa sýnt að með mælingu á rafviðnámi gegnum rottuhúð (TER) (12.–13. heimild) er hægt að greina með áreiðanlegum hætti á milli ætandi og óætandi efna (5. og 9. heimild).

Prófunin, sem er lýst í þessari aðferð, gerir kleift að sanngreina ætandi efni og blöndur. Prófunin gerir einnig kleift að sanngreina óætandi efni og blöndur þegar stuðst er við ákvörðun á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga þar sem notaðar eru aðrar, fyrirliggjandi upplýsingar (t.d. um sýrustig, vensl efnabyggingar og virkni og gögn um menn og/eða dýr) (1., 2., 11. og 14. heimild). Prófunin veitir ekki upplýsingar um húðertingu og heimilar heldur ekki þá undirflokkun ætandi efna sem leyfð er í hnattsamræmda flokkunarkerfinu (GHS) (1. heimild).

Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fylgt sé raðprófunaráætluninni sem fylgir sem viðbætir við prófunaraðferð B.4 (2. heimild) og sem kveðið er á um í hnattsamræmda kerfinu (1. heimild). Þessi prófunaráætlun felur í sér prófanir í glasi á húðætingu (eins og lýst er í þessari aðferð) og húðertingu áður en metið er hvort gera skuli prófanir á lifandi dýrum.

1.2. SKILGREININGAR

Húðæting í lífi: varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar og hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

Rafviðnám gegnum húð (TER). mælikvarði á samviðnám húðarinnar, sett fram í kílóómum (e. *kilo Ohms*). Þetta er einföld og traust aðferð til að meta tálmavirknina með því að skrá ferð jóna gegnum húðina með Wheatstone-brú.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Tafla 1

Viðmiðunaríðefni

Heiti	EINECS-nr.	CAS-nr.	
1,2-díamínóprópan	201-155-9	78-90-0	Mjög ætandi

Heiti	EINECS-nr.	CAS-nr.	
Akrýlsýra	201-177-9	79-10-7	Mjög ætandi
2-tert- Bútýlfenól	201-807-2	88-18-6	Ætandi
Kalíumhýdroxíð (10%)	215-181-3	1310-58-3	Ætandi
Brennisteinssýra (10%)	231-639-5	7664-93-9	Ætandi
Oktansýra (kaprýlsýra)	204-677-5	124-07-02	Ætandi
4-amínó-1,2,4-tríasól	209-533-5	584-13-4	Ekki ætandi
Evgenól	202-589-1	97-53-0	Ekki ætandi
Fenetýlbrómíð	203-130-8	103-63-9	Ekki ætandi
Tetraklóretýlen	204-825-9	27-18-4	Ekki ætandi
Ísósterínsýra	250-178-0	30399-84-9	Ekki ætandi
4-(metýlþíó)-bensaldehýð	222-365-7	3446-89-7	Ekki ætandi

Flest íðefnin á listanum eru tekin upp úr skrá yfir íðefni sem Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) valdi til alþjóðlegrar fullgildingarrannsóknar (4. heimild). Valið á þeim byggist á eftirfarandi viðmiðunum:

i. fjöldi ætandi og óætandi efna skal vera sá sami,

ii. efnin skulu ná yfir flesta viðeigandi efnaflokka og vera fáanleg á almennum markaði,

iii. bæði mjög ætandi sem og minna ætandi efni skulu höfð með til að unnt sé að greina efnin í sundur á grundvelli ætingarmáttar,

iv. velja skal íðefni sem hægt er að meðhöndla á rannsóknarstofu án þess að það hafi í för með sér aðrar alvarlegar hættur en hættu á ætingu.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er látið liggja í allt að 24 klukkustundir á yfirborði húðþekju húðflipa í tveggja hólfa prófunarkerfi þar sem húðflipinn gegnir hlutverki skilrúma milli hólfanna. Húðfliparnir eru teknar af 28–30 daga gömlum rottum sem hafa verið aflífaðar á mannúðlegan hátt. Ætandi efni eru sanngreind eftir hæfni þeirra til að skaða hornlag húðarinnar og draga úr tálmavirkni hennar en þetta mælist sem lækkun á rafviðnámi húðar niður fyrir viðmiðunarmörk (12. heimild). Fyrir rafviðnám gegnum húð hjá rottum hefur þröskuldsgildið 5 kΩ verið valið á grundvelli umfangsmikilla gagna fyrir vítt svið íðefna þar sem mikill meirihluti gildanna var ýmist vel yfir (oft > 10 kΩ) eða vel undir (oft < 3 kΩ) þessu gildi (12. heimild). Efni, sem eru óætandi í dýrum en eru ertandi eða óertandi, lækka að jafnaði ekki rafviðnámið gegnum húð niður fyrir þetta þröskuldsgildi. Enn fremur getur notkun annarra húðhluta eða annars búnaðar breytt þröskuldsgildinu og þar með gert frekari fullgildingu nauðsynlega.

Liður í prófunarferlinu er áfangi með leysilitarbindingu sem er staðfestingarprófun á jákvæðum niðurstöðum varðandi rafviðnám gegnum húð, þ.m.t. á gildum í kringum 5 kΩ. Áfanginn með leysilitarbindingu sýnir hvort aukning á jónalekt er vegna efnislegrar eyðileggingar á hornlagi húðarinnar. Mæling á rafviðnámi gegnum húð hefur sýnt sig að vera áreiðanleg aðferð (í glasi) til að segja fyrir um ætandi eiginleika hjá kanínum sem metnir eru með prófunaraðferð B.4 (2. heimild). Tekið skal fram að kanínuprófunin í glasi er mjög næm, að því er tekur til húðætingar og húðertingar, í samanburði við prófun með húðflipum úr mönnum (15. heimild).

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Dýr**

Rottur eru heppilegasta tegundin þar eð áður hefur verið sýnt fram á næmi húðar þeirra fyrir íðefnum í þessari prófun (10. heimild). Aldur rottanna (þegar húðin er tekin) og stofn eru sérstaklega mikilvægir þættir til að tryggja að hársekkir þeirra séu í hvíld áður en vöxtur á fullorðinshárum hefst.

Hár á baki og síðum á ungum, u.þ.b. 22 daga gömlum, karl- eða kvenrottum (af Wistar-stofni eða sambærilegum stofni) er fjarlægt gætilega með litlum hárklippum. Dýrin eru síðan þvegin vandlega með rökum klút meðan klippta svæðið er baðað í sýklalyfjalausn (sem inniheldur t.d. streptómýsín, penisillín, klóramfeníkól og amfóterisín í styrkleikum sem nægja til að hindra bakteríuvöxt). Dýrin eru þvegin aftur með sýklalyfjalausn á þriðja eða fjórða degi eftir fyrsta þvottinn og eru notuð innan þriggja daga frá öðrum þvotti þegar hornlag húðarinnar hefur jafnað sig eftir að hárin voru fjarlægð.

1.5.2. **Undirbúningur húðflipa**

Dýrin eru aflífuð á mannúðlegan hátt þegar þau eru 28–30 daga gömul, þessi aldur er mikilvægur. Því næst er húðin flegin af baki og síðum hvers dýrs og öll umframfita fjarlægð af undirhúðinni með því að kroppa hana gætilega af húðinni. Fjarlægðir eru húðflipar, hver um sig u.þ.b. 20 mm í þvermál. Húðina má geyma áður en fliparnir eru notaðir þar sem sýnt er að jákvæð og neikvæð samanburðargögn eru jafngild þeim sem fást með nýrri húð.

Hver húðflipi er settur yfir annan endann á röri úr PTFE (pólýtetraflúoretýleni) þannig að öruggt sé að yfirborð húðþekjunnar sé í snertingu við rörið. Til að húðin haldist á sínum stað er O-laga gúmmíhring þrýst þétt yfir endann á rörinu og umframvefur skorinn burt. Mál rörsins og O-hringsins eru gefin á mynd 2. Síðan er þétt með vaselíni á milli O-gúmmíhringsins og endans á PTFE-rörinu. Rörinu er haldið uppi með fjaðurklemmu inni í viðtakahólfi sem inniheldur magnesíumsúlfatlausn (154 mM) (mynd 1). Dýfa skal húðflipanum á kaf í magnesíumsúlfatlausnina. Hægt er að ná 10–15 húðflipum úr einni rottuhúð.

Áður en prófunin hefst er rafviðnám tveggja húðflipa mælt til að gæðaprófa húðina af hverju dýri. Báðir fliparnir ættu að gefa hærra viðnámsgildi en 10 kΩ ef hægt á að vera að nota afganginn af flipunum fyrir prófunina. Ef viðnámsgildið er minna en 10 kΩ skal farga flipunum sem eftir eru af þeirri húð.

1.5.3. **Prófunar- og samanburðarefni borin á**

Nota skal samskeiða, jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir hverja rannsókn til að tryggja fullnægjandi frammistöðu tilraunalíkansins. Nota skal húðflipa frá einu dýri. Ráðlögð jákvæð og neikvæð samanburðarefni eru 10 M saltsýra og eimað vatn, í þeirri röð.

Fljótandi prófunarefnum (150 µl) er dreift jafnt á yfirborð húðþekjunnar inni í rörinu. Þegar efni í föstu formi eru prófuð er nægilegt magn af fasta efninu sett jafnt á flipann til að tryggja að allt yfirborð húðþekjunnar sé þakið. Afjónuðu vatni (150 µl) er síðan hellt ofan á fasta efnið og rörið hrist varlega. Til að ná hámarkssnertingu við húðina getur þurft að hita föst efni upp í 30 °C til að bræða eða mýkja prófunarefnið eða mala þau til að mynda korn eða duft.

Þrír húðflipar eru notaðir fyrir hvert prófunar- og samanburðarefni. Prófunarefnin eru látin liggja á í 24 klukkustundir við 20–23 °C. Prófunarefnið er fjarlægt með því að skola það af undir kranavatnsbunu við allt að 30 °C þar til búið er að fjarlægja allt efni sem hægt er.

1.5.4. **Mælingar á rafviðnámi í húð**

Samviðnám húðar er mælt á sama hátt og rafviðnám gegnum húð með því að nota Wheatstone-brú með lágspenntum riðstraumi (13. heimild). Almennar forskriftir fyrir brúna eru 1–3 volta vinnsluspenna, 50–1000 herts, sínuslaga eða ferhyrndur riðstraumur og a.m.k. 0,1–30 kΩ mælisvið. Brúin, sem er notuð í fullgildingarrannsóknini, mælir span, rýmd og viðnám í gildum upp í 2000 H, 2000 µF og 2 MΩ, í þessari röð, við tíðnirnar 100 herts eða 1 kílóherts, með notkun raðtengdra eða hliðtengdra gilda. Að því er varðar rafviðnám gegnum húð eru mælingar á ætandi áhrifum skráðir í viðnámi, við tíðnina 100 rið og með því að nota raðgildi. Á undan mælingunni á rafviðnámi er yfirborðsspenna húðarinnar minnkuð með því að bæta við 70% etanóli í nægilegu magni til að þekja húðþekjuna. Eftir nokkrar sekúndur er etanólið fjarlægt úr rörinu og vefurinn er síðan vatnaður með því að bæta við 3 ml af magnesíumsúlfatlausn (154 mM). Rafskaut brúarinnar eru sett hvort sínum megin á húðflipann til að mæla viðnámið sem kΩ/húðflipa (mynd 1). Á mynd 2 má sjá mál rafskautanna og lengd þess hluta rafskautsins sem er undir krókódílaklemmunum. Klemman á innra rafskautinu er látin hvíla á toppi PTFE-rörsins meðan á viðnámsmælingunni stendur til að tryggja að lengd þess hluta rafskautsins, sem er ofan í magnesíumsúlfatlausninni, haldist óbreytt. Ytra rafskautinu er komið fyrir inni í viðtakahólfinu þannig að

það hvíli á botni hólfsins. Fjarlægðinni milli neðsta hluta fjaðurklemmunnar og botns PTFE-rörsins skal haldið stöðugri (mynd 2) þar eð þessi fjarlægð hefur áhrif á mæligildi viðnámsins. Af sömu ástæðu skal halda fjarlægðinni milli innra rafskautsins og húðflipans stöðugri og sem minnstri (1–2 mm).

Ef mælda viðnámsgildið er hærra en 20 kΩ getur ástæðan verið sú að leifar af prófunarefninu þekja yfirborðið á húðþekju húðflipans. Reyna má að fjarlægja þetta þekjandi efni, t.d. með því að halda fyrir PTFE-rörið með hanskaklæddum þumalfingri og hrista hana í u.þ.b. 10 sekúndur; magnesíums-úlfatlausninni er síðan fleygt og viðnámsmælingin endurtekin með nýju magnesíumsúlfati.

Eiginleikar og mál prófunarbúnaðarins og tilraunaferlið, sem er notað, geta haft áhrif á gildin sem fást fyrir rafviðnám gegnum húð. Viðmiðunarmörkin 5 kΩ fyrir ætandi áhrif voru ákvörðuð út frá gögnum sem aflað var með þeim tiltekna búnaði og verkferli sem er lýst í þessari aðferð. Mismunandi viðmiðunarmörk og samanburðargildi kunna að eiga við ef aðstæðum við prófun er breytt eða öðruvísi búnaður notaður. Því er nauðsynlegt að kvarða aðferðina og viðmiðunargildin fyrir viðnámið með því að gera prófanir á röð viðmiðunarstaðla, sem valdir eru úr íðefnunum sem notuð eru í fullgildingarrannsókninni (4. og 5. heimild), eða úr efnaflokkum sem líkjast íðefnunum sem verið er að rannsaka. Nokkur viðeigandi viðmiðunaríðefni eru sýnd í töflu 1.

1.5.5. **Aðferðir við bindingu leysilitar**

Váhrif frá tilteknum óætandi efnum getur orðið til þess að viðnámið lækkar niður fyrir þröskuldsgildið 5 kΩ svo að jónir geta farið í gegnum hornlag húðarinnar og lækkað þannig rafviðnámið (5. heimild). Til dæmis geta hlutlaus, lífræn efni og íðefni með yfirborðsvirka eiginleika (s.s. þvotta- og hreinsiefni, ýruefni og önnur yfirborðsvirk efni) fjarlægt húðlípíð og aukið jónalekt gegnum tálmann. Ef gildin fyrir rafviðnám gegnum húð fyrir prófunarefnin eru undir eða í kringum 5 kΩ og engar skemmdir er að sjá skal meta hversu djúpt leysiliturinn þrengir sér í samanburðar- og meðferðarvefina til að ákvarða hvort mældu gildin fyrir rafviðnám gegnum húð voru vegna aukins gegndræpis húðarinnar eða vegna húðætingar (3. og 5. heimild). Í síðarnefnda tilvikinu, þar sem hornlag húðarinnar er rofið, smýgur leysiliturinn súlforhódamín-B hratt í gegnum húðyfirborðið, þegar hann er borinn á það, og litar undirliggjandi vef. Þessi tiltekni leysilitur er stöðugur gagnvart margs konar íðefnum og útdráttaraðferðin, sem lýst er hér á eftir, hefur ekki áhrif á hann.

1.5.5.1. *Leysiliturinn súlforhódamín-B borinn á og fjarlægður*

Að loknu mati á rafviðnámi gegnum húð er magnesíumsúlfatinu úr túpunni hent og húðin skoðuð vandlega með tilliti til greinilegra skemmda. Ef engar greinilegar skemmdir eru á húðinni eru 150 µl af 10% (þyngd miðað við rúmmál) lausn leysilitarins súlforhódamíns-B (Acid Red 52, C.I. 45100, EINECS-númer 222-529-8, CAS-númer 3520-42-1) í eimuðu vatni látnir liggja á yfirborði húðþekju hvers húðflipa í tvær klukkustundir. Þessir húðflipar eru síðan skolaðir undir kranavatnsbunu við allt að herbergishita í u.þ.b. 10 sekúndur til að fjarlægja umframmagn leysilitar eða óbundinn leysilit. Hver húðflipi er tekinn gætilega af PTFE-rörinu og settur í hettuglas (t.d. 20 ml glas til sindurmælinga) sem inniheldur afjónað vatn (8 ml). Hettuglösin eru hrist varlega í 5 mínútur til að fjarlægja allar leifar af óbundnum leysilit. Þetta skolunarferli er síðan endurtekið og húðfliparnir því næst fjarlægðir og settir í hettuglös með 5 ml af 30% (þyngd miðað við rúmmál) natríumdódekýlsúlfati í eimuðu vatni, og hafðir í hitaskáp yfir nótt við 60 °C.

Eftir þetta er hver húðflipi fjarlægður og honum fleygt og lausnin, sem eftir er, skilin í skilvindu í 8 mínútur við 21 °C (hlutfallslegur miðflóttakraftur ~ 175 × g). Þá er 1 ml sýnis af flotinu þynntur í rúmmálshlutfallinu 1 á móti 5 (þ.e. 1 ml + 4 ml) með 30% (þyngd miðað við rúmmál) af natríumdódekýlsúlfati í eimuðu vatni. Ljósþéttni lausnarinnar er mæld við 565 nm.

1.5.5.2. *Útreikningur á leysilitarinnihaldi*

Innihald leysilitarins súlforhódamíns-B í hverjum flipa er reiknað út frá ljósþéttnigildunum (5. heimild) (móleðlisgleypnistuðullinn fyrir leysilitinn súlforhódamín-B við 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$, sameindaþyngd = 580). Leysilitarinnihaldið er ákvarðað fyrir hvern húðflipa með því að nota viðeigandi kvörðunarferil og meðalleysilitarinnihaldið er síðan reiknað út fyrir alla húðflipana.

2. **GÖGN**

Viðnámsgildi (kΩ) og gildi fyrir meðalleysilitarinnihald (µg/flipa), eftir því sem við á, skulu sett fram í töfluformi fyrir prófunarefnið og jákvæð og neikvæð samanburðarefni (einstök tilraunagögn og meðaltöl ± staðalfrávik), þ.m.t. gögn um samhliða/endurteknar tilraunir, meðalgildi og einstök gildi.

2.1. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Meðalgildi niðurstaðna úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð er tekið gilt ef samskeiða, jákvæðu og neikvæðu samanburðargildin falla innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina sem er notuð á prófunarstofunni. Viðurkennd viðnámssvið fyrir aðferðina og búnaðinn, sem lýst er hér að framan, eru gefin í eftirfarandi töflu:

Samanburður	Efni	Viðnámssvið (kΩ)
Jákvæður	10 M saltsýra	0,5–1,0
Neikvæður	Eimað vatn	10–25

Meðalgildi niðurstaðna fyrir bindingu leysilitar eru tekin gild ef samskeiða samanburðargildin falla innan viðurkenndra marka fyrir aðferðina. Tillögur að ásættanlegum dreifisviðum leysilitarinnihalds fyrir samanburðarefnin, aðferðina og búnaðinn, sem er lýst hér að framan, eru settar fram hér að neðan:

Samanburður	Efni	Dreifisvið leysilitarinnihalds (μg/flipa)
Jákvæður	10 M saltsýra	40–100
Neikvæður	Eimað vatn	15-35

Prófunarefnið telst ekki vera húðætandi:

i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð, sem fæst fyrir prófunarefnið, er hærra en 5 kΩ eða

ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð er minna en eða jafnt og 5 kΩ og

— húðflipinn er ekki með neinar greinilegar skemmdir og

— meðalleysilitarinnihald flipans er vel fyrir neðan meðalleysilitarinnihald flipans í jákvæða, samskeiða samanburðinum með 10 M HCl.

Prófunarefnið telst vera húðætandi:

i. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð er minna en eða jafnt og 5 kΩ og húðflipinn er greinilega skaddaður eða

ii. ef meðalgildið fyrir rafviðnám gegnum húð er minna en eða jafnt og 5 kΩ og

— húðflipinn er ekki með neinar greinilegar skemmdir en

— meðalleysilitar innihald flipans er meira en eða jafnt og meðalleysilitarinnihald flipans í samskeiða, jákvæða samanburðinum með 10 M HCl.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunar- og samanburðarefni:

— efnaheiti, s.s. IUPAC-heiti eða CAS-heiti og CAS-númer, ef þau eru þekkt,

— hreinleiki og samsetning efnisins eða efnablöndunnar (í hundraðshlutum, miðað við þyngd) og eðlisástand,

— eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, sýrustig, stöðugleiki og vatnsleysni,

— meðhöndlun prófunarefna og samanburðarefna fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun),

— stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Tilraunadýr:

— stofn og kyn,

— aldur dýranna þegar þau eru notuð sem gjafadýr,

— uppruni, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— lýsing á undirbúningi húðhlutans.

Prófunarskilyrði:

— kvörðunarferlar fyrir prófunarbúnað,

— kvörðunarferlar fyrir framkvæmd prófunar á bindingu leysilitar,

— upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mælingar á rafviðnámi gegnum húð,

— upplýsingar um prófunarferlið sem er notað við mat á leysilitarbindingunni, ef við á,

— lýsing á hvers kyns breytingum á prófunarferlunum,

— lýsing á matsviðmiðunum sem notaðar eru.

Niðurstöður:

— gögn úr mælingum á rafviðnámi gegnum húð og leysilitarbindingu (ef við á) skulu sett fram í töfluformi fyrir hvert dýr og hvert húðsýni,

— lýsing á öllum áhrifum sem vart verður.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

2) Prófunaraðferð B.4. Bráð eiturhrif: Húðerting/Húðæting.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, bls. 219-255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology. In Vitro 12, bls. 471-482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology. In Vitro 12, bls. 483- 524.

6) OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, bls. 62.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, bls. 129-147.

8) ICCVAM, (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

9) ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C., (1986) An in vitro skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J., (1992) The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial. Toxic. In Vitro 6, bls. 191-194.

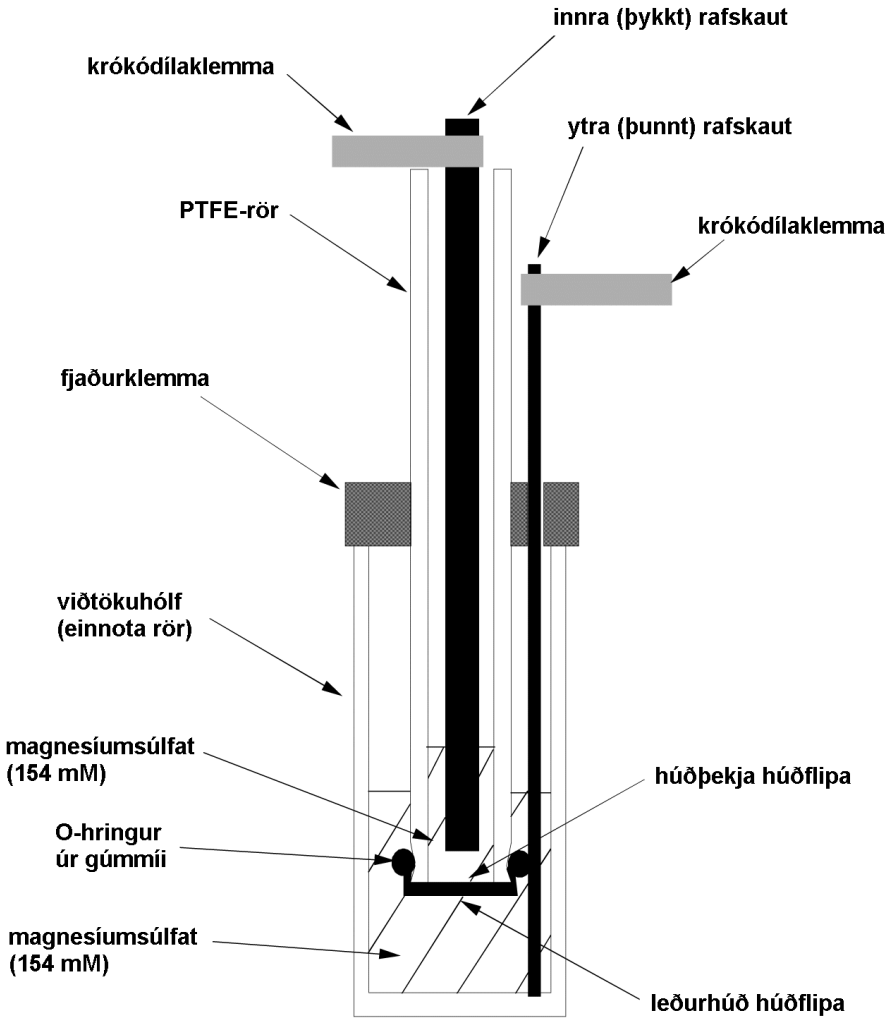
14) Worth A.P., Fentem J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, bls. 709-720

15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M., (1997) The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, bls. 845-852.

16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C., (1988) An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxicology In Vitro. 2, bls. 7-17.

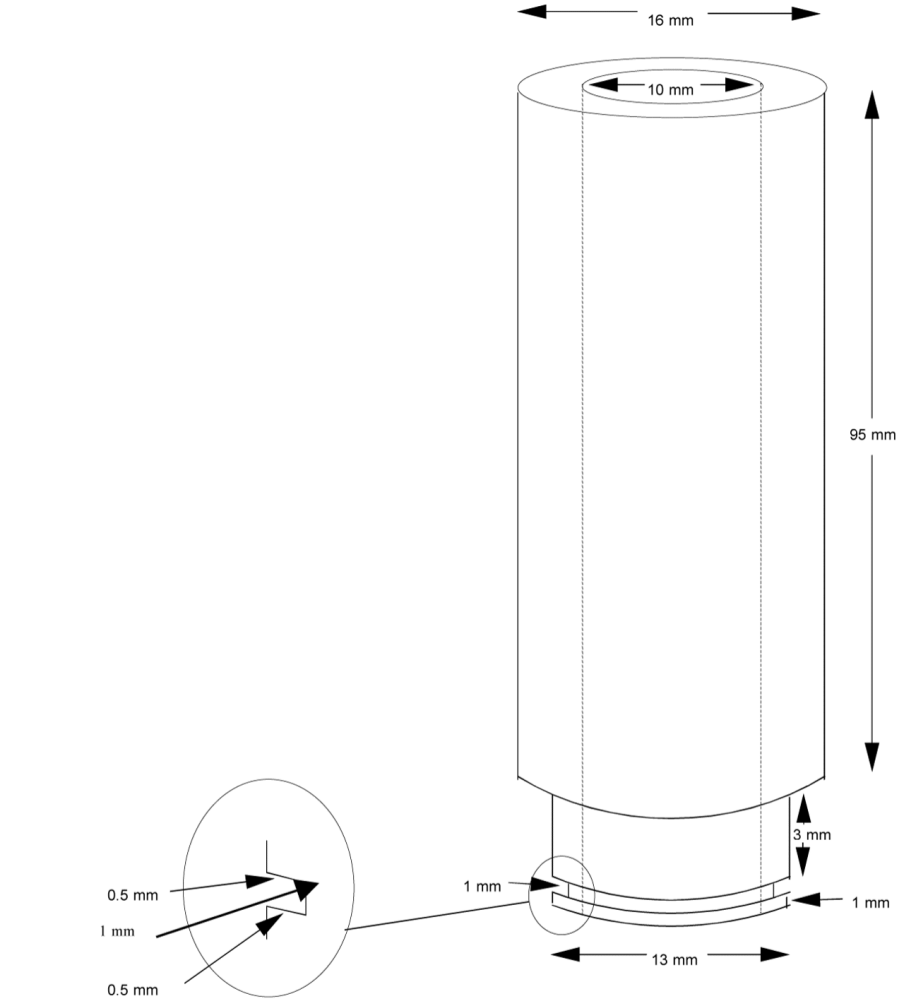
Mynd 1

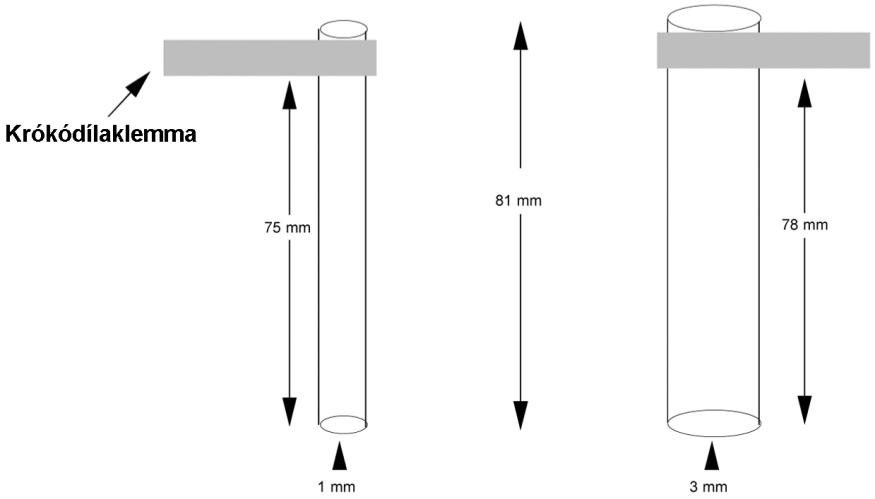
Búnaður fyrir mælingu á rafviðnámi gegnum rottuhúð



Mynd 2

Stærðarmál pólýtetraflúoretýlen-rörsins og viðtökurörsins og rafskautanna sem eru notuð





Mikilvægir þættir búnaðarins sem sýndur er hér að framan:

— innra þvermál PTFE-rörsins,

— lengd rafskautanna í hlutfalli við PTFE-rörið og viðtökurörið: rafskautin eiga ekki að snerta húðflipann og rafskaut af staðallengd á að vera í snertingu við magnesíumsúlfatlausnina,

— magnið af magnesíumsúlfatlausn í viðtökurörinu: dýpt vökvans, í hlutfalli við hæðina í PTFE-rörinu, á að vera eins og sýnt er á mynd 1,

— húðflipann þarf að festa nægilega vel á PTFE-rörið til að rafviðnámið sé raunsönn mæling á eiginleikum húðarinnar.

B.40a. ***RANNSÓKN Í GLASI Á HÚÐÆTINGU: PRÓFUN MEÐ LÍKANI AF MANNSHÚÐ***

1. **AÐFERÐ**

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 431 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Með húðætingu er átt við varanlega vefjaskemmd í húð eftir að prófunarefni hefur verið borið á hana (samkvæmt skilgreiningu í hnattsamræmda kerfinu til flokkunar og merkingar á efnum og efnablöndum (GHS)) (1. heimild). Þessi prófunaraðferð krefst ekki notkunar á lifandi dýrum eða dýravef við mat á húðætandi áhrifum.

Mat á húðætingu hefur oftast falið í sér notkun tilraunadýra (2. heimild). Komið hefur verið til móts við áhyggjur af sársauka og þjáningum dýra, sem notuð hafa verið í þessu verkferli, með því að endurskoða prófunaraðferð B.4 til að gera það kleift að ákvarða húðætingu með staðgönguaðferðum í glasi svo að komist verði hjá því að valda dýrum sársauka og þjáningum.

Fyrsta skrefið í átt að skilgreiningu á staðgönguaðferðum, sem hægt væri að nota fyrir prófanir í eftirlitsskyni á húðætingu, var að framkvæma forfullgildingarrannsókn (3. heimild). Eftir það var gerð formleg fullgildingarrannsókn (6.–8. heimild) á aðferðum með prófun í glasi til að meta húðætingu (4. og 5. heimild). Niðurstöður þessara rannsókna og annarra birtra skrifa (9. heimild) varð til þess að mælt var með því að eftirfarandi prófanir yrðu notaðar við mat í lífi á húðætingu (10.–13. heimild): prófun með líkani af mannshúð (þessi aðferð) og prófun á rafviðnámi gegnum húð (sjá prófunaraðferð B.40).

Fullgildingarrannsóknir hafa sýnt að með prófunum þar sem notuð eru líkön af mannshúð (3., 4., 5. og 9. heimild) er hægt að greina með áreiðanlegum hætti á milli húðætandi efna og efna sem eru ekki húðætandi. Aðferðarlýsing prófunarinnar getur einnig gefið vísbendingar um hvernig greina skuli á milli mjög húðætandi og minna húðætandi efna.

Prófunin, sem er lýst í þessari aðferð, gerir kleift að sanngreina ætandi efni og blöndur. Prófunin gerir einnig kleift að sanngreina óætandi efni og efnablöndur þegar stuðst er við ákvörðun á grundvelli vægis rökstuddra vísbendinga þar sem notaðar eru aðrar, fyrirliggjandi upplýsingar (t.d. um sýrustig, vensl efnabyggingar og virkni og gögn um menn og/eða dýr) (1., 2., 13. og 14. heimild). Prófunin veitir að jafnaði ekki fullnægjandi upplýsingar um húðertingu og heimilar heldur ekki þá undirflokkun ætandi efna sem leyfð er í hnattsamræmda flokkunarkerfinu (GHS) (1. heimild).

Fyrir fullt mat á staðbundnum áhrifum á húð eftir váhrif á húð í eitt skipti er mælt með því að fylgt sé raðprófunaráætluninni sem fylgir sem viðbætir við prófunaraðferð B.4 (2. heimild) og sem kveðið er á um í hnattsamræmda kerfinu (1. heimild). Þessi prófunaráætlun felur í sér prófanir í glasi á húðætingu (eins og lýst er í þessari aðferð) og húðertingu áður en metið er hvort gera skuli prófanir á lifandi dýrum.

1.2. SKILGREININGAR

Húðæting í lífi: varanleg skemmd í húð sem kemur fram eftir að prófunarefni hefur verið á húðinni í allt að fjórar klukkustundir, þ.e. sýnilegt drep sem nær í gegnum húðþekjuna og niður í leðurhúðina. Ætandi svörun einkennist af sárum, blæðingu, blæðandi hrúðri og, í lok 14 daga athugunartímabilsins, upplitun þegar húðin fölnar og hárlausum blettum og örum. Til greina kemur að gera vefjameinafræðilegar athuganir til að meta vefjaskemmdir sem vafi leikur á um.

Lífvænleiki frumna: mæliþáttur fyrir heildarvirkni frumuhóps (t.d. getu vetnissvipta í hvatberum frumna til að afoxa líflitinn MTT) en heildarvirknin svarar til heildarfjölda og/eða lífsþróttar frumnanna og er háð endapunktinum sem er mældur og prófunarhönnuninni sem er notuð.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Tafla 1

Viðmiðunaríðefni

Heiti	EINECS-nr.	CAS-nr.	
1,2-díamínóprópan	201-155-9	78-90-0	Mjög ætandi

Heiti	EINECS-nr.	CAS-nr.	
Akrýlsýra	201-177-9	79-10-7	Mjög ætandi
2-tert. bútýlfenól	201-807-2	88-18-6	Ætandi
Kalíumhýdroxíð (10%)	215-181-3	1310-58-3	Ætandi
Brennisteinssýra (10%)	231-639-5	7664-93-9	Ætandi
Oktansýra (kaprýlsýra)	204-677-5	124-07-02	Ætandi
4-amínó-1,2,4-tríasól	209-533-5	584-13-4	Ekki ætandi
Evgenól	202-589-1	97-53-0	Ekki ætandi
Fenetýlbrómíð	203-130-8	103-63-9	Ekki ætandi
Tetraklóretýlen	204-825-9	27-18-4	Ekki ætandi
Ísósterínsýra	250-178-0	30399-84-9	Ekki ætandi
4-(metýlþíó)-bensaldehýð	222-365-7	3446-89-7	Ekki ætandi

Flest íðefnin á listanum eru tekin upp úr skrá yfir íðefni sem Evrópumiðstöð um fullgildingu staðgönguaðferða (ECVAM) valdi til alþjóðlegrar fullgildingarrannsóknar (4. heimild). Valið á þeim byggist á eftirfarandi viðmiðunum:

i. fjöldi ætandi og óætandi efna skal vera sá sami,

ii. efnin skulu ná yfir flesta viðeigandi efnaflokka og vera fáanleg á almennum markaði,

iii. bæði mjög ætandi sem og minna ætandi efni skulu höfð með til að unnt sé að greina efnin í sundur á grundvelli ætingarmáttar,

iv. velja skal íðefni sem hægt er að meðhöndla á rannsóknarstofu án þess að það hafi í för með sér aðrar alvarlegar hættur en hættu á ætingu.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er borið staðbundið á þrívítt líkan af mannshúð sem samanstendur a.m.k. af endurgerð húðþekju með starfhæfu hornlagi. Ætandi efni eru sanngreind eftir hæfni þeirra til að minnka lífvænleika frumna (sem t.d. má ákvarða með magngreiningu með afoxun MTT (15. heimild)) niður fyrir skilgreind viðmiðunarmörk eftir váhrif frá þessum efnum í tiltekinn tíma. Meginregla prófunarinnar með líkani af mannshúð byggist á þeirri tilgátu að ætandi íðefni geti gengið inn í hornlag húðarinnar með flæði eða rofi og séu frumudrepandi fyrir undirliggjandi frumulög.

1.4.1. **Verklag**

1.4.1.1. *Líkön af mannshúð*

Líkön af mannshúð má framleiða eða fá á almennum markaði (t.d. líkönin EpiDermTM og EPISKINTM) (16.–19. heimild) eða þróa þau eða búa þau til á prófunarstofunni (20.–21. heimild). Viðurkennt er að notkun mannshúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu. Öll ný líkön skal fullgilda (a.m.k. að því marki sem lýst er undir 1.4.1.1.2). Líkön af mannshúð, sem eru notuð við þessa prófun, verða að vera í samræmi við eftirfarandi:

1.4.1.1.1. Almenn skilyrði viðvíkjandi líkaninu:

Nota skal hyrnisfrumur úr manni til að útbúa útþekjuna. Í henni skulu vera mörg lög af lifvænlegum þekjufrumum undir virku hornlagi. Húðlíkanið má einnig vera með lagi úr uppistöðuvef. Hornlagið skal vera marglaga og með því lípíðsniði sem er nauðsynlegt til að veita virka, trausta tálmun gegn því að frumudrepandi markefni, gangi hratt inn í það. Afmörkunareiginleikar líkansins skulu koma í veg fyrir að efni flytjist um hornlagið að lifvænlega vefnum. Flutningur prófunaríðefna um hornlagið myndi skerða getu líkansins til að lýsa váhrifum á húð. Húðlíkanið skal vera laust við smit af völdum baktería (þ.m.t. berfryminga) eða sveppa.

1.4.1.1.2. Skilyrði viðvíkjandi virkni líkansins:

Lífvænleiki er venjulega magngreindur með því að nota MTT eða aðra lífliti sem er umbreytt með efnaskiptum. Í þeim tilvikum ætti ljósþéttni (uppleysta) leysilitarins, sem dreginn er út úr neikvæða samanburðarvefnum, að vera a.m.k. tuttugu sinnum meiri en ljósþéttni útdráttarleysisins eins (sjá yfirlit í 22. heimild). Neikvæði samanburðarvefurinn skal vera stöðugur í ræktun (gefa svipaðar lífvænleika-mælingar) allt váhrifatímabil prófunarinnar. Hornlagið þarf að vera nægilega traust til að hindra hraða gegnþrengingu tiltekinna frumudrepandi markefna (t.d. 1% Triton X-100). Þennan eiginleika má meta með váhrifatímanum sem þarf til að minnka lífvænleika frumna um 50% (ET_{50}) (t.d. er hann > 2 klst. fyrir líkönin EpiDermTM og EPISKINTM. Vefurinn skal vera endurgerðarhæfur í langan tíma og helst á milli rannsóknarstofa. Einnig skal vera hægt að nota hann til að spá fyrir um ætingarmátt viðmiðunaríðefnanna (sjá töflu 1) þegar þau eru notuð í samræmi við aðferðarlýsinguna sem valin er.

1.4.1.2. *Áburður prófunar- og samanburðarefna*

Tvö samhliða vefjasýni eru notuð fyrir hverja meðferð (hvern váhrifatíma), þ.m.t samanburðarsýni. Þegar um er að ræða fljótandi efni verður að bera nægilegt magn af prófunarefninu á húðina til að þekja hana jafnt: nota skal að lágmarki 25 µl/cm^2. Þegar um er að ræða föst efni verður að bera nægilegt magn af prófunarefninu jafnt á húðina og væta efnið með afjónuðu eða eimuðu vatni til að tryggja góða snertingu við húðina. Eftir því sem við á skal mala föst efni í duft áður en þau eru borin á. Notkunaraðferðin skal hæfa prófunarefninu (sjá t.d. 5. heimild). Í lok váhrifatímabilsins skal skola prófunarefnið vandlega af yfirborði húðarinnar með viðeigandi jafnalausn eða 0,9% NaCl.

Nota skal samskeiða, jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir hverja rannsókn til að tryggja fullnægjandi frammistöðu tilraunalíkansins. Mælt er með ísediki eða 8N KOH sem jákvæðu samanburðarefni. Mælt er með 0,9% NaCl eða vatni sem neikvæðu samanburðarefni.

1.4.1.3. *Mælingar á lífvænleika frumna*

Aðeins má nota megindlegar, fullgiltar aðferðir til að mæla lífvænleika frumna. Enn fremur þarf lífvænleikamælingin að vera samhæfð notkun í þrívíðum vefhlut. Ósérhæfð leysilitarbinding má ekki trufla lífvænleikamælinguna. Próteinbindandi leysilitir og leysilitir sem umbreytast ekki með efnaskiptum (s.s. hlutlaus rauður (e. *neutral red*)) henta því ekki. Algengasta magngreiningin er MTT-afoxun (MTT: 3-(4,5-dímetýlþíasól-2ýl)-2,5-dífenýltetrasólíumbrómíð, þíasólýl-blár: EINECS númer 206-069-5, CAS númer 298-93-1)) sem sýnt hefur verið að gefur nákvæmar og samanburðarnákvæmar niðurstöður (5. heimild) en nota má aðrar aðferðir. Húðsýnið er sett í MTT-lausn í hæfilegum styrk (t.d. 0,3–1 mg/ml) og látið standa við hæfilegt hitastig í þrjár klukkustundir. Útfellt, blátt formasan er síðan dregið út með leysi (ísóprópanóli) og styrkur formasans mældur með því að ákvarða ljósþéttni við bylgjulengd milli 540–595 nm.

Efnræn verkun prófunarefnisins á líflitinn getur líkt eftir frumuefnaskiptum og leitt til falskrar niðurstöðu fyrir lífvænleika. Sýnt hefur verið að þetta gerist þegar þess konar prófunarefni er ekki fjarlægt fullkomlega af húðinni með skolun (9. heimild). Ef prófunarefnið verkar beint á líflitinn skal nota viðbótarsamanburð til að greina og leiðrétta fyrir truflandi áhrifum prófunarefnisins á lífvænleika-mælingarnar (9. og 23. heimild).

2. **GÖGN**

Fyrir hvern vef skal setja ljósþéttnigildi og gögn um reiknaðan hundraðshluta fyrir lífvænleika frumna fram í töfluformi fyrir prófunarefnið og jákvæðan og neikvæðan samanburð, þ.m.t. gögn um samhliða/endurteknar tilraunir, eftir því sem við á, meðalgildi og einstök gildi.

2.1. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Nota má ljósþéttnigildin, sem fást með hverju prófunarsýni, til að reikna út lífvænleika í hundraðshlutum í samanburði við neikvæða samanburðarefnið sem er látið gilda 100%. Þröskuldsgildið fyrir hundraðshluta lífvænleika frumna, sem greinir á milli ætandi og óætandi prófunarefna (eða greinir á milli mismunandi flokka ætandi efna), eða tölfræðiaðferðin eða -aðferðirnar sem eru notaðar til að meta niðurstöðurnar og sanngreina ætandi efni, skulu skilgreind á skýran hátt og skjalfest og einnig skal sýna fram á hentugleika þeirra. Að jafnaði eru þessi þröskuldsgildi ákveðin við bestun prófunarinnar, forprófuð á undan fullgildingarrannsókninni og staðfest með fullgildingarrannsókn. Spáin um ætandi eiginleika samkvæmt EpiDermTM-líkaninu er t.d. (9. heimild):

Prófunarefnið telst vera húðætandi:

i. ef lífvænleiki eftir váhrif í þrjár mínútur er minni en 50% eða

ii. ef lífvænleiki eftir váhrif í þrjár mínútur er a.m.k. 50% og lífvænleiki eftir váhrif í klukkustund er minni en 15%.

Prófunarefnið telst ekki vera húðætandi:

i. ef lífvænleiki eftir váhrif í þrjár mínútur er a.m.k. 50% og lífvænleiki eftir váhrif í klukkustund er meiri en eða jafngildir 15%.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunar- og samanburðarefni:

— efnaheiti, s.s. IUPAC-heiti eða CAS-heiti og CAS-númer, ef þau eru þekkt,

— hreinleiki og samsetning efnisins eða blöndunnar (í hundraðshlutum, miðað við þyngd),

— eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli fyrir framkvæmd rannsóknarinnar, s.s. eðlisástand, sýrustig, stöðugleiki og vatnsleysni,

— meðhöndlun prófunarefna og samanburðarefna fyrir prófun, ef við á (t.d. hitun, mölun),

— stöðugleiki, ef hann er þekktur.

Rökstuðningur fyrir vali á húðlíkaninu og aðferðarlýsingunni sem notuð eru.

Prófunarskilyrði:

— frumukerfið sem er notað,

— kvörðunarupplýsingar um mælibúnaðinn sem er notaður til að mæla lífvænleika frumna (t.d. litrófsmælir),

— heildarupplýsingar til stuðnings notkunar á viðkomandi húðlíkani, þ.m.t. fullgilding þess,

— upplýsingar um prófunarferlið sem er notað,

— prófunarskammtar sem eru notaðir,

— lýsing á öllum breytingum á prófunaraðferðinni,

— tilvísanir í rannsóknarsöguleg gögn um líkanið,

— lýsing á þeim matsviðmiðunum sem eru notaðar.

Niðurstöður:

— gögn úr hverju prófunarsýni sett upp í töflu,

— lýsing á öðrum áhrifum sem fram komu.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstaða.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono (2001)6.

2) Prófunaraðferð B.4. Bráð eiturhrif: Húðerting/Húðæting.

3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M., (1995) A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, bls. 219-255.

4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxicology In Vitro 12, bls. 471-482.

5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M., (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 12, bls. 483-524.

6) OECD, (1996) Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, bls. 62.

7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F., (1995) Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, bls. 129-147.

8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (1997) Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf.

9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G., (2000) The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, bls. 371-401.

10) ECVAM, (1998) ECVAM News & Views. ATLA 26, bls. 275-280.

11) ECVAM, (2000) ECVAM News & Views. ATLA 28, bls. 365-67.

12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)., (2002) ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.

13) OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st–2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

14) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M., (1998) An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, bls. 709-720.

15) Mosmann, T., (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, bls. 55-63.

16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxicology In Vitro 8, bls. 889-891.

17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterisation of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, bls. 211-225.

18) Tinois, E., Gaetani, Q., Gayraud, B., Dupont, D., Rougier, A., Pouradier, D.X., (1994) The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach, bls. 133-140

19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post–transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193, bls. 310-319

20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H., (1992) The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, bls. 163-171.

21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L., (1994) Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, bls. 747-756.

22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J., (1995) A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, bls. 69-84.

23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A., (2001) A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxicology In Vitro 15, bls. 57-93.

B.41. *3T3-NRU–LJÓSEITURHRIFAPRÓFUN Í GLASI*

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 432 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Ljóseiturhrif eru skilgreind sem eiturefnasvörun við efni sem borið er á líkamann og er annaðhvort vakin eða aukin (greinilegt við minni skammtastærðir) við váhrif frá ljósi, eða sem eiturefnasvörun sem er framkölluð með ágeislun á húð eftir að efni hefur verið gefið á altækan hátt.

3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi er notuð til að sanngreina ljóseiturhrifamátt prófunarefnis sem örvaða íðefnið kallar fram eftir váhrif frá ljósi. Með prófuninni eru ljóseiturhrif á frumur metin út frá hlutfallslegri minnkun á lífvænleika frumna sem eru látnar verða fyrir váhrifum frá íðefninu í ljósi og án ljóss. Efni sem eru sanngreind með þessari prófun eru líkleg til að valda ljóseiturhrifum í lífi eftir altækan áburð og dreifingu á húðina eða eftir staðbundinn áburð.

Skýrt hefur verið frá mörgum tegundum íðefna sem framkalla ljóseiturhrif (1.–4. heimild). Sameiginlegt einkenni þeirra er að þau geta gleypt ljósorku á bylgjusviði sólarljóss. Samkvæmt fyrsta lögmáli ljósefnafræðinnar (lögmál Grotthaus-Drapers) geta ljósefnahvörf ekki orðið fyrr en nægilega margir ljósskammtar hafa verið gleyptir. Áður en hugað er að líffræðilegri prófun verður því ákvarða gleypniróf prófunaríðefnisins á bylgjulengdarbili ÚF/sýnilegs ljóss samkvæmt OECD-viðmiðunarreglu 101 um prófanir. Gert hefur verið ráð fyrir að sé móleðlisgleypnistuðullinn/mólgleypnistuðullinn minni en 10 lítrar × mól^{-1} × cm^{-1} þá sé ólíklegt að efnið sé ljóshvarfgjarnt (e. *photoreactive*). Slíkt íðefni þarf e.t.v. ekki að prófa með 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi né öðrum líffræðilegum prófunum á skaðlegum ljósefnafræðilegum áhrifum (1. og 5. heimild). Sjá einnig 1. viðbæti.

Nýlega var unnið mat á áreiðanleika og gildi 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófunar í glasi (6–9. heimild). 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi reyndist hafa forspárgildi um bráð ljóseiturhrif í lífi hjá dýrum og mönnum. Prófunin er ekki hönnuð til að spá fyrir um önnur skaðleg áhrif sem kunna að verða af sameinaðri virkni íðefnis og ljóss, t.d nær prófunin ekki yfir ljóseiturhrif á erfðaefni, ljósofnæmi eða krabbameinsvaldandi áhrif ljóss og ekki er hægt að nota hana til að meta ljóseiturhrifamátt. Prófið hefur heldur ekki verið hannað til að sýna óbein gangvirki ljóseiturhrifa, áhrif umbrotsefna prófunarefnisins eða áhrif blandna.

Þótt notkun efnaskiptakerfa sé almenn krafa sem gildir um allar prófanir í glasi sem spá fyrir um hugsanleg erfðaeiturhrif og krabbameinsvaldandi áhrif eru enn aðeins fá dæmi í ljóseiturefnafræðinni um íðefni sem útheimta efnaskiptaumbreytingar til að íðefnið geti virkað sem ljóseiturefni í lífi eða í glasi. Því er hvorki talið nauðsynlegt né vísindalega réttlætanlegt að þessi prófun sé framkvæmd með kerfi fyrir efnaskiptavirkjun.

1.2. SKILGREININGAR

Ágeislunarstyrkur: styrkur útfjólublás (ÚF) eða sýnilegs ljóss sem fellur á yfirborð, mældur í W/m^2 eða mW/cm^2.

Skammtur ljóss: magn (= styrkur × tími) útfjólublárrar (ÚF) eða sýnilegrar geislunar sem fellur á yfirborð, gefið upp í júlum (= W × s) á hverja flatarmálseiningu, t.d. J/m^2 eða J/cm^2.

Bylgjulengdarbil útfjólublás ljóss: táknanir, sem Alþjóðaljósráðið (CIE) mælir með, eru sem hér segir: ÚFA (e. UVA) (315–400 nm), ÚFB (e. UVB) (280–315 nm) og ÚFC (e. UVC) (100–280 nm). Aðrar táknanir eru einnig notaðar, skipting milli ÚFB og ÚFA er oft sett við 320 nm og skipta má ÚFA í ÚF-A1 og ÚF-A2 með skiptingu við u.þ.b. 340 nm.

Lífvænleiki frumna: mæliþáttur fyrir heildarvirkni frumuhóps (t.d. upptöku líflitarins hlutlauss rauðs (e. *Neutral Red* (NR)) í leysikorn frumna) en heildarvirknin svarar til heildarfjölda og/eða lífsþróttar frumnanna og er háð endapunktinum, sem er mældur, og prófunarsniðinu sem er notað.

Hlutfallslegur lífvænleiki frumna: lífvænleiki frumna er gefinn upp miðað við neikvæðan samanburð (með leysi) sem hefur verið viðhafður allt prófunarferlið (annaðhvort með ágeislun (+ ágeislun (e. *+Irr*)) eða án ágeislunar (– ágeislun (e. *–Irr.*)) en án meðferðar með prófunaríðefninu.

Ljósertingarstuðull (e. PIF: *Photo-Irritation-Factor*): stuðull sem er fenginn með samanburðar-mælingum á tveimur jafnvirkum frumudrepandi styrkleikum (IC_{50}) prófunaríðefnisins sem fást án ágeislunar (– ágeislun) og með ágeislun (+ ágeislun) með ÚFA/sýnilegu ljósi sem er ekki frumudrepandi.

IC_{50}: sá styrkur prófunaríðefnis sem minnkar lífvænleika frumna um 50%.

Meðaláhrif ljóss (e. MPE: *Mean-Photo-Effect*): mælistærð sem er leidd út með stærðfræðilegri greiningu á ferlunum fyrir styrkháða svörun sem fást án ágeislunar (– ágeislun) og með ágeislun (+ ágeislun) með ÚFA/sýnilegu ljósi sem er ekki frumudrepandi.

Ljóseiturhrif: bráð eiturhrifasvörun, sem kemur fram eftir að húðin hefur orðið fyrir váhrifum frá tilteknum íðefnum í fyrsta sinn og þar á eftir fyrir váhrifum frá ljósi, eða sem er framkölluð á svipaðan hátt með ágeislun húðar eftir að íðefni hefur verið gefið á altækan hátt.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi byggist á samanburði á frumueiturhrifum íðefnis þegar það er prófað með og án váhrifa frá skammti af sólarljósseftirlíkingu sem er ekki frumudrepandi. Frumueiturhrif í þessari prófun eru gefin upp sem styrkháð minnkun á upptöku líflitarins hlutlauss rauðs við mælingu 24 klukkustundum eftir meðferð með prófunaríðefninu og ágeislun (10. heimild). Hlutlaus rauður er dauft plúshlaðið litarefni (e. *weak cationic dye*) sem þrengir sér auðveldlega í gegnum frumuhimnur með öðrum hætti en flæði (e. *by non-diffusion*) og safnast upp í leysikornum inni í frumunum. Breytingar á yfirborði næmrar himnu leysikornanna leiða til þess að leysikornin verða viðkvæm og leiða einnig til annarra breytinga sem smám saman verða óafturkræfar. Slíkar breytingar, sem verða vegna virkni líframandi efna, leiða til minnkaðrar upptöku og bindingar á hlutlausa rauða líflitnum. Því er mögulegt að greina á milli lífvænlegra, skemmdra eða dauðra frumna, en það er grundvöllur þessarar prófunar.

Balb/c-3T3-frumur eru hafðar í ræktun í 24 klukkustundir til að mynda einlög. Tveir 96-holu-bakkar fyrir hvert prófunaríðefni eru forræktaðir með átta mismunandi styrkleikum prófunarefnisins í 1 klukkustund. Síðan er annar bakkinn látinn verða fyrir váhrifum frá hæsta ágeislunarskammtinum, sem er ekki frumudrepandi, meðan hinn bakkinn er hafður í myrkri. Ræktunaræti er svo sett á báða bakkana í staðinn fyrir meðferðarætið og eftir aðra 24 klukkustunda ræktun er lífvænleiki frumna ákvarðaður út frá upptöku á líflitnum hlutlausum, rauðum. Lífvænleiki frumna er gefinn upp sem hundraðshluti af ómeðhöndluðum leysissamanburði og er reiknaður út fyrir hvern prófunarstyrkleika. Til að spá fyrir um ljóseiturhrifamátt eru borin saman sú styrkháða svörun sem fæst með ágeislun og sú sem fæst án ágeislunar, yfirleitt á styrkstiginu IC_{50}, sem er styrkurinn sem minnkar lífvænleika frumna í 50% miðað við ómeðhöndlaðan samanburð.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Undirbúningur**

1.4.1.1. *Frumur*

Í fullgildingarrannsókninni var notuð stöðug trefjakímfrumulína úr mús, Balb/c-3T3, klón 31, annaðhvort frá Ameríska stofnasafninu (e. *American Type Culture Collection* (ATCC)), Manassas, VA, BNA, eða frá Evrópska frumuræktarsafninu (e. *European Collection of Cell Cultures* (ECACC)), Salisbury, Wiltshire, Bretlandi, og þess vegna er mælt með því að frumur séu fengnar frá viðurkenndum frumuvörsluaðila. Nota má aðrar frumur eða frumulínur með sama prófunarferli, ef ræktunarskilyrðin eru löguð að sérþörfum frumnanna, en sýna verður fram á jafngildi þeirra.

Fylgjast skal reglulega með frumunum til að ganga úr skugga um að þær séu lausar við berfrymingasmit og þær má einungis nota ef ekkert smit finnst (11. heimild).

Mikilvægt er að fylgjast reglulega með næmi frumnanna fyrir útfjólublá ljósi samkvæmt gæðaeftirlitsferlinu sem lýst er í þessari aðferð. Þar eð ÚFA-næmi frumna getur aukist við hverja umsáningu skal nota Balb/c-3T3-frumur með lægstu fáanlegu umsáningartölu, helst lægri en 100. (Sjá lið 1.4.2.2.2 og 2. viðbæti).

1.4.1.2. *Æti og ræktunarskilyrði*

Nota skal viðeigandi ræktunaræti og ræktunarskilyrði fyrir kerfisbundna umsáningu frumna og meðan á prófunarferlinu stendur, fyrir Balb/c-3T3-frumur er t.d. notað DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), að viðbættu 10% sermi úr nýbornum kálfum, mM glútamíni, penisillíni (100 IU) og streptómýsíni (100 µg/ml) og ræktun með rakagjöf við 37 °C og 5–7,5% koltvísýringsinnihald, eftir því hver jafnalausnin er (sjá aðra málsgrein liðar 1.4.1.4). Það er sérstaklega mikilvægt að frumuræktunarskilyrðin séu með þeim hætti að tímalengd frumuhrings falli innan eðlilegra marka, samkvæmt rannsóknarsögulegum gögnum, fyrir frumurnar eða frumulínuna sem er notuð.

1.4.1.3. *Undirbúningur ræktа*

Frumum úr frosnum geymslustofnum er sáð í ræktunaræti með viðeigandi þéttleika og afræktað a.m.k. einu sinni áður en þær eru notaðar í 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi.

Frumum, sem notaðar eru í ljóseiturhrifaprófun, er sáð í ræktunaræti með viðeigandi þéttleika svo að ræktunin hafi ekki náð samrennsli við lok prófunarinnar, þ.e. þegar lífvænleiki frumna er ákvarðaður 48 klukkustundum eftir að frumunum var sáð. Fyrir Balb/c-3T3-frumur, sem eru ræktaðar á 96-holu-bökkum, er ráðlagður sáningarþéttleiki frumna 1×10^4 frumur í hverja holu.

Fyrir hvert prófunaríðefni er frumunum sáð á sama hátt á tvo aðskilda 96-holu-bakka, sem síðan eru látnir fara samskeiða í gegnum allt prófunarferlið við sömu ræktunarskilyrði, að undanskildu tímabilinu þar sem annar bakkinn er ágeislaður (+ ágeislun) og hinn er hafður í myrkri (– ágeislun).

1.4.1.4. *Undirbúningur prófunarefnis*

Prófunarefni skulu vera fersk og löguð rétt fyrir notkun nema gögn sýni fram á stöðugleika efnanna við geymslu. Mælt er með að því að öll efnræn meðhöndlun og upphafsmeðferð frumna fari fram við ljósaðstæður sem leiða ekki til ljósvirkjunar eða sundrunar prófunarefnisins á undan ágeisluninni.

Prófunaríðefnin skal leysa upp í jöfnuðum saltlausnum, t.d. jafnaðri saltlausn samkvæmt EARL (EBSS) eða öðrum lífeðlisfræðilega jafnvægum jafnalausnum sem verða að vera lausar við prótínþætti og ljósgleypna þætti (t.d. pH-litvísi, liti og vítamín) til að forðast truflun meðan á ágeislun stendur. Þar eð frumur eru hafðar utan CO_2-ræktunarkassans í um 50 mínútur meðan á ágeislun stendur þarf að gæta þess að koma í veg fyrir sýrustigshækkun (e. *alkalisation*). Ef notaðar eru veikar jafnalausnir eins og EBSS má koma í veg fyrir sýrustigshækkun með því að rækta frumurnar við 7,5% koltvísýringsinnihald. Ef frumurnar eru ræktaðar við aðeins 5% koltvísýringsinnihald skal velja sterkari jafnalausn.

Prófunaríðefni með takmarkaða leysni í vatni skulu leyst upp í viðeigandi leysi. Ef leysir er notaður þarf hann að vera í föstu rúmmáli í öllum ræktum, þ.e. í neikvæðum leysissamanburði sem og í öllum styrkleikum prófunaríðefnisins, og má ekki vera frumudrepandi í þeim styrkleika sem er notaður. Velja skal styrkleika prófunaríðefnisins m.t.t. þess að koma í veg fyrir botnfall og skýjaðar lausnir.

Mælt er með því að nota dímetýlsúlfoxíð (DMSO) og etanól (EtOH) sem leysa. Aðrir leysar með lítil frumueiturhrif geta hentað. Áður en kemur að notkun skal meta alla leysa að því er varðar sértæka eiginleika, t.d. efnahvarf við prófunaríðefnið, deyfingu ljóseiturhrifa, eiginleika til að hlutleysa stakeindir og/eða efnrænan stöðugleika í leysinum.

Nota má iðublöndun og/eða hátíðnihljóðsundrun og/eða hitun upp í viðeigandi hitastig til að auðvelda uppleysingu nema það geti haft áhrif á stöðugleika prófunaríðefnisins.

1.4.1.5. *Ágeislunarskilyrði*

1.4.1.5.1. Ljósgjafi

Val á viðeigandi ljósgjafa og síum skipta höfuðmáli við ljóseiturhrifaprófun. Ljós á ÚFA-sviðinu og sýnilega sviðinu tengist venjulega ljóseiturhrifasvörun í lífi (3. og 12. heimild) en aftur á móti skiptir ljós á ÚFB-sviðinu minna máli en hefur mikil eiturhrif á frumur og frumueiturhrif þess aukast þúsundfalt þegar bylgjulengdin fer frá 313 í 280 nm (13. heimild). Viðmiðanir fyrir val á viðeigandi ljósgjafa verða að fela í sér þá kröfu að ljósgjafinn sendi frá sér bylgjulengdir, sem prófunaríðefnið gleypir í sig (gleypniróf), og að ljósskammturinn (sem næst innan hæfilegs váhrifatíma) sé nægilega mikill til að hægt sé að greina íðefni sem vitað er að hafa ljóseiturhrif á frumur. Enn fremur skulu bylgjulengdir og skammtar, sem notaðir eru, ekki vera óþarflega skaðleg prófunarkerfinu, s.s. varmaútgeislun (á innrauðu sviði).

Eftirlíking sólarljóss með sólarhermum þykir ákjósanlegasti ljósgjafinn. Dreifing ágeislunaraflsins í síaða sólarherminum skal vera svipuð og dreifing dagsljóss utandyra sem gefin er upp í 14. heimild. Bæði xenón-bogar og (efnabættir) kvikasilfursmálmhalíðbogar eru notaðir sem sólarhermar (15. heimild). Þeir síðarnefndu hafa þann kost að láta frá sér minni varma og eru ódýrari en þeir líkja ekki eins nákvæmlega eftir sólarljósi og Xenón-bogar. Þar eð allir sólarhermar gefa frá sér umtalsvert magn af ÚFB skulu notaðar viðeigandi síur til að draga úr hinum miklu frumueiturhrifum ÚFB-bylgjulengdanna. Vegna þess að plastefni fyrir frumuræktun innihalda ÚF-stöðgara skal mæla tíðnirófið með loki af 96-holu-bakka af sömu gerð og verður notað í greiningunni. Þrátt fyrir ráðstafanir, sem gerðar eru til að veikja hluta rófsins með síun, eða fyrir óumflýjanleg síunaráhrif búnaðarins skal rófið, sem er mælt undir þessum síum, ekki víkja frá stöðluðu dagsljósi utandyra (14. heimild). Í 8. og 16. heimild er gefið dæmi um dreifingu rófbundins ágeislunarstyrks (e. *spectral irradiance*) í síaða sólarherminum sem notaður er í fullgildingarrannsókninni á 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi. Sjá einnig mynd 1 í 2. viðbæti.

1.4.1.5.2. Skammtamælingar

Kanna skal reglulega styrk ljóss (ágeislunarstyrk) fyrir hverja ljóseiturhrifaprófun með viðeigandi breiðbandsmæli fyrir útfjólublátt ljós. Styrkinn skal mæla í gegnum sömu gerð af loki af 96-holu-bakka og verður notuð í rannsókninni. ÚF-mælirinn skal hafa verið kvarðaður við ljósgjafann. Kanna skal nothæfi

ÚF-mælisins og er mælt með því að til þess sé notaður annar ÚF-mælir af sömu gerð og með sömu kvörðun til viðmiðunar. Æskilegast er að nota öðru hverju rófgeislunarrófsmæli til að mæla rófbundinn ágeislunarstyrk síaða ljósgjafans og til að kanna kvörðun ÚF-breiðbandsmælisins.

Ákvarðað var að skammtur, sem nemur 5 J/cm^2 (mælt á ÚFA-sviðinu), hefði ekki eiturhrif á Balb/c-3T3-frumur og væri nægilega öflugur til að örva íðefni til að kalla fram ljóseiturhrifasvörun (e. *phototoxic reaction*) (6. og 17. heimild), t.d. var ágeislunarstyrkurinn stilltur á 1,7 mW/cm^2 til að ná 5 J/cm^2 innan 50 mínútna. Sjá mynd 2 í 2. viðbæti. Ef önnur frumulína eða annar ljósgjafi eru notuð getur þurft að kvarða ágeislunarskammtinn svo að hægt sé að velja skömmtunaráætlun sem er ekki skaðleg frumunum en fullnægjandi til að örva venjuleg ljóseiturefni. Tímalengd ljósváhrifa er reiknuð á eftirfarandi hátt:

$$t(\text{mín}) = \frac{\text{geislunarskammtur (J/cm}^2) \times 1000}{\text{ágeislunarstyrkur (mW/cm}^2) \times 60} \qquad (1\ \text{J} = 1\ \text{Wsek})$$

1.4.2. **Prófunarskilyrði**

1.4.2.1. *Styrkleikar prófunarefnis*

Styrksvið íðefnis, sem er prófað með (+ ágeislun) og án (– ágeislun) ljóss, skal ákvarða á fullnægjandi hátt í skammtastærðartilraunum. Gagnlegt getur verið að meta leysni í upphafi og eftir 60 mínútur (eða eftir þann meðferðartíma sem ætlunin er að nota) þar eð leysni getur breyst með tímanum eða meðan á váhrifum stendur. Til að komast hjá eiturhrifum vegna óviðeigandi ræktunarskilyrða eða vegna mjög súrra eða basískra efna skal sýrustig frumuræktа, að viðbættu prófunaríðefni, vera á bilinu 6,5–7,8.

Mesti styrkur prófunarefnisins skal vera innan lífeðlisfræðilegra aðstæðna við prófun, þ.e. varast skal álag vegna osmósu og sýrustigs. Eftir því hvert prófunaríðefnið er getur verið nauðsynlegt að taka til athugunar aðra eðlisefnafræðilega eiginleika, m.t.t. þess hvort þeir séu takmarkandi þættir fyrir mesta prófunarstyrk. Fyrir efni með hlutfallslega litla leysni, sem eru ekki eitruð við styrkleika allt að mettunarstyrkleika, skal prófa mesta styrk sem hægt er að ná. Að jafnaði skal reynt að koma í veg fyrir útfellingu prófunaríðefnisins við alla prófunarstyrkleika. Hámarksstyrkur prófunarefnis skal ekki vera meiri en 1000 µg/ml, osmólstyrkur skal ekki vera yfir 10 mmól. Nota skal jafnhlutfalla þynningarraðir átta styrkleika af prófunarefninu með föstum þynningarstuðli (sjá aðra málsgrein liðar 2.1).

Ef upplýsingar liggja fyrir (úr styrkstærðartilraun) um að prófunaríðefnið sé ekki frumudrepandi upp að efstu styrkmörkum í myrkurtilrauninni (– ágeislun) en sé mjög frumudrepandi þegar það er ágeislað (+ ágeislun) er hægt að velja önnur styrksvið fyrir ágeislunartilraunina en fyrir myrkurtilraunina til að uppfylla kröfur um fullnægjandi gæði gagna.

1.4.2.2. *Samanburður*

1.4.2.2.1. Geislunarnæmi frumna, ákvörðun rannsóknarsögulegra gagna:

Reglulega (við u.þ.b. fimmtu hverja umsáningu) skal kanna næmi frumna fyrir ljósgjafanum með því að meta lífvænleika þeirra eftir váhrif frá stækkandi ágeislunarskömmtum. Við þetta mat skal nota nokkra ágeislunarskammta, þ.m.t. skammta sem eru verulega stærri en þeir sem eru notaðir við 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófunina. Þessa skammta er auðveldast að ákvarða með mælingum á ÚF-hluta ljósgjafans. Frumunum er sáð með sama þéttleika og notaður er í 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi og þær ágeislaðar næsta dag. Lífvænleiki frumnanna er síðan ákvarðaður einum degi síðar með því að nota upptöku hlutlauss, rauðs líflitar. Sýna skal fram á að stærsti skammturinn sem fékkst og var ekki frumudrepandi (t.d. í fullgildingarrannsókninni: 5 J/cm^2 (ÚFA)) nægði til að flokka viðmiðunaríðefnin (sjá töflu 1) rétt.

1.4.2.2.2. Geislunarnæmi, eftirlit með yfirstandandi prófun:

Prófunin uppfyllir gæðaviðmiðanir ef ágeislaðar samanburðarræktir, neikvæðar eða með leysi, sýna meira en 80% lífvænleika í samanburði við samanburðarræktir, neikvæðar eða með leysi, sem eru óágeislaðar.

1.4.2.2.3. Lífvænleiki samanburðarræktа með leysi:

Algild ljósþéttni ($OD_{540\ NRU}$) hlutlauss, rauðs líflitar, sem dreginn er út úr leysissamanburðarræktum, segir til um hvort þær 1×10^4 frumur, sem sáð var í hverja holu, hafi vaxið á venjulegum tvöföldunartíma á þeim tveimur dögum sem prófunin fór fram. Prófun uppfyllir samþykktarviðmiðanir ef meðalgildi $OD_{540\ NRU}$ fyrir samanburðarræktir án meðferðar er $\geq 0{,}4$ (þ.e. um 20 sinnum bakgrunnsgleypni leysisins).

1.4.2.2.4. Jákvæður samanburður:

Samskeiða hverri 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi skal fara fram prófun á þekktu íðefni sem veldur ljóseiturhrifum. Mælt er með klórprómasíni (CPZ). Fyrir klórprómasín, sem er prófað eftir stöðluðu aðferðalýsingunni fyrir 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófun í glasi, voru eftirfarandi samþykktarviðmiðanir fyrir prófun skilgreindar: Ágeislað klórprómasín (+ ágeislun): IC_{50} = 0,1–2,0 µg/ml, óágeislað klórprómasín (– ágeislun): IC_{50} = 7,0–90,0 µg/ml. Ljósertingarstuðullinn (PIF) skal vera > 6. Fylgjast þarf með rannsóknarsögulegum árangri jákvæða samanburðarins.

Önnur þekkt íðefni sem valda ljóseiturhrifum og henta fyrir efnaflokk eða leysnieiginleika íðefnisins, sem verið er að meta, má nota sem samskeiða, jákvæð samanburðarefni í stað klórprómasíns.

1.4.3. **Prófunaraðferð (6., 7., 8., 16. og 17. heimild):**

1.4.3.1. *1. dagur:*

Setja skal 100 µl af ræktunaræti í jaðarholur 96-holu míkrótítrunarbakka fyrir vefjaræktun (= blanksýni). Í hinar holurnar skal setja 100 µl af frumulausn með 1×10^5 frumur/ml í ræktunaræti (= 1×10^4 frumur á holu). Útbúa skal tvo bakka fyrir hverja röð af hverjum styrkleikum prófunarefnisins og fyrir leysissamanburðinn og jákvæða samanburðinn.

Frumurnar eru ræktaðar í 24 klst. (sjá lið 1.4.1.2) þar til þær mynda hálfsamfellt einlag. Ræktun í þennan tíma gerir frumunum kleift að ná sér aftur, ná að loða hver við aðra og vaxa veldisvexti.

1.4.3.2. *2 dagur:*

Eftir ræktun er ræktunarætinu hellt af frumunum og þær þvegnar gætilega með 150 µl af jafnalausninni sem notuð var við ræktunina. Bætt er við 100 µl af jafnalausn sem inniheldur viðeigandi styrk prófunaríðefnis eða leysis (samanburður með leysi). Átta mismunandi styrkleikar prófunaríðefnisins eru notaðir. Frumurnar með prófunarefninu eru ræktaðar í myrkri í 60 mínútur (sjá aðra málsgrein liðar 1.4.1.2 og 1.4.1.4).

Af bökkunum tveimur, sem voru útbúnir fyrir hverja styrkleikaröð af prófunarefni og fyrir samanburð, er annar valinn, venjulega með slembivali, til ákvörðunar á frumueiturhrifum (– ágeislun) (þ.e. samanburðar-bakkinn) og hinn (meðferðarbakkinn) fyrir ákvörðun á ljóseiturhrifum á frumur (+ ágeislun).

Til að beita váhrifum með + ágeislun skal ágeisla frumurnar við stofuhita í 50 mínútur gegnum lokið á 96-holu-bakkanum með hæsta geislunarskammtinum sem er ekki frumudrepandi (sjá einnig 2. viðbæti). Óágeisluðu bakkarnir (– ágeislun) eru hafðir við stofuhita í myrku boxi í 50 mínútur (= ljósváhrifatími).

Prófunarlausninni er hellt af og þvegið tvisvar gætilega með 150 µl af jöfnuðu lausninni sem notuð var við ræktunina en inniheldur ekki prófunarefnið. Ræktunarætið er sett í staðinn fyrir jafnalausnina og ræktað (sjá lið 1.4.1.2) yfir nótt (18–22 klst).

1.4.3.3. *3. dagur:*

1.4.3.3.1. Smásjárrannsókn

Skoða skal vöxt, formfræði og heilleika frumna í einlaginu með fasasmásjá. Skrá skal breytingar á frumubyggingu og áhrif á frumuvöxt.

1.4.3.3.2. Prófun á upptöku hlutlauss, rauðs líflitar.

Frumurnar eru þvegnar með 150 µl af forhituðu jafnalausninni. Þvottalausnin er fjarlægð með því að banka varlega í bakkann. Bætt er við 100 µl af 50 µg/ml af NR (hlutlausum, rauðum líflit) (3-amínó-7-dímetýlamínó-2-metýlfenazín-hýdróklóríð, EINECS-númer 209-035-8, CAS-númer 553-24-2, litaskrárnúmer 50040) í æti án sermis (16. heimild) og ræktað, eins og lýst er í málsgrein 1.4.1.2, í 3 klst. Eftir ræktun skal fjarlægja NR-ætið og þvo frumurnar með 150 µl af jafnalausninni. Jafnalausninni er hellt af og umframjafnalausn fjarlægð með þerripappír eða skiljun í skilvindu.

Bætt er við nákvæmlega 150 µl afsogslausn af hlutlausum, rauðum líflit (fersk lausn gerð úr 49 hlutum vatns + 50 hlutum af etanóli + 1 hluta af ediksýru).

Hristið míkrótítrunarbakkann varlega á hristara fyrir míkrótítrunarbakka í 10 mínútur þar til hlutlausi, rauði líflíturinn hefur verið dreginn út úr frumunum og hefur myndað einsleita lausn.

Ljósþéttni útdregna hlutlausa, rauða líflitarins er mæld við 540 nm í litrófsmæli og blanklausn notuð sem viðmið. Vistið gögn á viðeigandi rafrænu skjalasniði fyrir síðari greiningu.

2. GÖGN

2.1. GÆÐI OG MAGN GAGNA

Út frá prófunargögnunum skal vera hægt að gera marktæka greiningu á þeirri styrkháðu svörun sem fæst með ágeislun og án ágeislunar og, ef unnt er, einnig á þeim styrkleika prófunaríðefnis sem minnkar lífvænleika frumna í 50% (IC_{50}). Ef frumueiturhrif koma fram skal fastsetja bæði styrkleikabilið og frávik einstakra styrkleika með þeim hætti að hægt sé að laga feril að tilraunagögnunum.

Fyrir bæði skýrt jákvæðar og skýrt neikvæðar niðurstöður (sjá fyrstu málsgrein liðar 2.3) getur aðalrannsóknin, með stoð í einni eða fleiri undirbúningstilraunum til að ákvarða skammtasvið, verið fullnægjandi.

Tvíræðar, vafasamar eða óvissar niðurstöður skal skýra með frekari prófunum (sjá einnig aðra málsgrein liðar 2.4). Í slíkum tilvikum skal taka til athugunar hvort breyta ætti tilraunaskilyrðum. Tilraunaskilyrði, sem má breyta, eru m.a. styrksvið eða styrkbil, forræktunartími og tími ágeislunarváhrifa. Styttri váhrifatími kann að henta fyrir íðefni sem eru óstöðug í vatni.

2.2. MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Til að auðvelda mat á gögnum má reikna út ljósertingarstuðul (e. PIF: *Photo-Irritation-Factor*) eða meðaláhrif ljóss (e. MPE: *Mean Photo Effect*).

Fyrir útreikning á mælingum á ljóseiturhrifum á frumur (sjá aftar) verður að námunda hópinn af stökum styrksvörunargildum með viðeigandi, samfelldum styrksvörunarferli (líkani). Aðlögun ferilsins að gögnunum er venjulega gerð með ólínulegri aðhvarfsaðferð (18. heimild). Til að meta áhrif gagna-breytileika á aðlagaða ferilinn er mælt með slembiúrtakanálgun.

Ljósertingarstuðull (PIF) er reiknaður með eftirfarandi formúlu:

$$PIF = \frac{IC_{50}(- \text{ ágeislun})}{IC_{50}(+ \text{ ágeislun})}$$

Ef ekki er hægt að reikna IC_{50} í viðurvist ljóss eða án ljóss er ekki hægt að ákvarða ljósertingarstuðul fyrir prófunarefnið. Meðaláhrif ljóss (MPE) byggjast á samanburði á fullkomnum styrksvörunarferlum (19. heimild). Þau eru skilgreind sem vegið meðaltal dæmigerðs safns gilda fyrir ljósáhrifa:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Ljósáhrifin PE_c við styrkinn C eru skilgreind sem margfeldi svörunaráhrifanna RE_c og skammtaáhrifanna DE_c, þ.e. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Svörunaráhrifin RE_c eru mismunurinn á þeim svörunum sem fram koma í viðurvist ljóss og án ljóss, þ.e. $RE_c = R_c$ (– ágeislun) – R_c (+ ágeislun). Skammtaáhrifin eru gefin með

$$DE_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

þar sem C* stendur fyrir jafngildisstyrk, þ.e. styrkinn þar sem svörunin við + ágeislun jafngildir svörun við – ágeislun við styrkinn C. Ef ekki er hægt að ákvarða C*, vegna þess að svörunargildi +ágeislunarferilsins eru kerfisbundið hærri eða lægri en R_C (– ágeislun), eru skammtaáhrifin sett á 1. Vægisstuðlarnir w_i eru gefnir með hæsta svörunargildinu, þ.e. w_i = MAX {R_i (+ ágeislun), R_i (– ágeislun) }. Styrktaflan C_i er valin þannig að sami fjöldi punkta falli í hvert styrkbilanna sem eru skilgreind með styrkgildunum sem eru notuð í tilrauninni. Útreikningur á meðaláhrifum ljóss (MPE) takmarkast við hámarksstyrkgildið þar sem a.m.k. annar af ferlunum tveimur sýnir ennþá svörunargildi sem nemur a.m.k. 10%. Ef þessi hámarksstyrkur er meiri en mesti styrkurinn sem er notaður í tilrauninni með + ágeislun er sá hluti +ágeislunarferilsins sem eftir er settur á svörunargildið „0“. Eftir því hvort gildið fyrir meðaláhrif ljóss (MPE-gildið) er stærra en rétt valið þröskuldsgildi (MPE_c = 0,15), eða ekki, er íðefnið flokkað sem ljóseitrað.

Hugbúnaðarpakki fyrir útreikning á ljósertingarstuðli (PIF) og meðaláhrifum ljóss (MPE) er fáanlegur hjá http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html (20. heimild).

2.3. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Spáin fyrir prófunarefni með PIF < 2 eða MPE < 0,1 er samkvæmt fullgildingarrannsókninni (8. heimild): „engin ljóseiturhrif“. Með PIF > 2 og < 5 eða MPE > 0,1 og < 0,15 er spáin: „líkleg ljóseiturhrif“ og með PIF > 5 eða MPE > 0,15 er spáin: „ljóseiturhrif“.

Rannsóknarstofur, sem taka upp þessa greiningu í fyrsta skipti, skulu gera prófanir á viðmiðunarefnunum, sem talin eru upp í töflu 1, áður en farið er í prófanir til að meta ljóseiturhrif prófunarefna. PIF- og MPE-gildi skulu vera nálægt þeim gildum sem gefin eru upp í töflu 1.

Tafla 1

Efnaheiti	EINECS-nr.	CAS-nr.	Ljósertingarstuðull (PIF)	Meðaláhrif ljóss (MPE)	Gleypnitoppgildi	Leysir (1)
amíódarón HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,2–0,54	242 nm 300 nm (öxl)	etanól
klórprómasín HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanól
norfloxasín	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	asetónítríl.
antrasen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	asetónítríl.
prótóforfýrín IX, dínatríum	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanól
L-histidín		[7006-35-1]	enginn ljósert-ingar-stuðull (PIF)	0,05–0,10	211 nm	vatn
hexaklórófen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (öxl)	etanól
Natríumlárýl-súlfat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00-0,05	engin gleypni	vatn

(1) Leysir sem er notaður til að mæla gleypni.

2.4. TÚLKUN GAGNA

Ef ljóseiturhrif koma aðeins fram við mesta prófunarstyrkinn (sérstaklega fyrir vatnsleysanleg prófunaríðefni) geta viðbótarathuganir verið nauðsynlegar fyrir hættumat. Þetta getur átt við gögn um upptöku um húð og uppsöfnun íðefnisins í húðinni og/eða gögn úr öðrum prófunum, t.d. prófunum í glasi á íðefninu í húð dýra eða manna eða prófanir með húðlíkönum.

Ef engin eiturhrif hafa komið fram (+ ágeislun og – ágeislun) og ef lítil leysni takmarkaði þá styrkleika sem hægt var að prófa má draga í efa að prófunarefnið hæfi fyrir greininguna og ætti þá að yfirvega að gera staðfestingarrannsókn, t.d. með öðru líkani.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu a.m.k. vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— auðkennisgögn, algeng, almenn heiti og IUPAC- og CAS-númer, ef þau eru þekkt,

— eðlisástand og hreinleiki,

— eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem tengjast framkvæmd þessarar rannsóknar,

— gleypniróf fyrir ÚF/sýnilegt ljós,

— stöðugleiki og stöðugleiki gagnvart ljósi, liggi þær upplýsingar fyrir.

Leysir:

— rök fyrir vali á leysi,

— leysni prófunaríðefnisins í leysi,

— hundraðshluti leysis í meðferðarætinu.

Frumur:

— gerð og uppruni frumna,

— upplýsingar um að frumurnar séu ekki smitaðar berfrymingum,

— umsáningartala frumnanna, ef hún er þekkt,

— geislunarnæmi frumna, ákvarðað með ágeislunarbúnaðinum sem er notaður í 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófuninni í glasi.

Prófunarskilyrði (1. heimild), ræktun fyrir og eftir meðferð:

— gerð og samsetning ræktunarætis,

— skilyrði við ræktun (koltvísýringsstyrkur, hitastig, rakastig),

— lengd ræktunartíma (fyrir meðferð, eftir meðferð).

Prófunarskilyrði (2. heimild), meðferð með íðefninu:

— rök fyrir vali á styrkleikum prófunaríðefnis sem notaðir eru í viðurvist ágeislunar og án ágeislunar,

— rök fyrir mesta styrk sem er prófaður, ef um er að ræða prófunaríðefni með takmarkaða leysni og engin frumueiturhrif,

— gerð og samsetning meðferðarætisins (jöfnuð saltlausn),

— lengd meðferðartíma með prófunarefninu.

Prófunarskilyrði (3. heimild), *ágeislun*:

— rök fyrir vali á ljósgjafanum sem er notaður,

— framleiðandi og tegund ljósgjafa og geislunarmælis,

— eiginleikar ljósgjafans m.t.t. rófbundins ágeislunarstyrks,

— gegnskins- (e. *transmission*) og gleypnieiginleikar síunnar eða síanna sem eru notaðar,

— eiginleikar geislunarmælisins og upplýsingar um kvörðun hans,

— fjarlægð ljósgjafans frá prófunarkerfinu,

— ÚFA-ágeislunarstyrkur í þessari fjarlægð, gefinn upp í mW/cm^2,

— tímalengd váhrifa með ÚF/sýnilegu ljósi,

— ÚFA-skammtur (ágeislunarstyrkur × tími), gefinn upp í J/cm^2,

— hitastig í frumuræktum meðan á ágeislun stendur og í samskeiða frumuræktum sem eru hafðar í myrkri.

Prófunarskilyrði (4. heimild), *prófun á lífvænleika með hlutlausum, rauðum líflit*:

— samsetning meðferðarætis sem inniheldur hlutlausan, rauðan líflit,

— lengd ræktunartíma með hlutlausum, rauðum líflit,

— skilyrði við ræktun (koltvísýringsstyrkur, hitastig, rakastig),

— skilyrði við útdrátt á hlutlausum, rauðum líflit (útdráttarleysir, tímalengd),

— bylgjulengd sem er notuð fyrir litrófsmælingu á ljósþéttni hlutlauss, rauðs líflitar,

— önnur bylgjulengd (viðmiðun), ef hún er notuð,

— innihald blanksýnis fyrir litrófsmælinn, ef við á.

Niðurstöður:

— lífvænleiki frumna við hvern styrkleika prófunaríðefnisins, gefinn upp sem hundraðshluti meðallífvænleika samskeiða samanburðarrækta með leysi,

— styrksvörunarferlar (styrkur prófunaríðefnis á móti hlutfallslegum lífvænleika frumna), sem fást í samskeiða tilraunum með og án ágeislunar,

— greining á styrksvörunarferlunum: útreikningur á IC_{50} (+ ágeislun) og IC_{50} (– ágeislun), ef unnt er,

— samanburður á styrksvörunarferlunum tveimur, sem fást annarsvegar með ágeislun og hinsvegar án ágeislunar, annaðhvort með því að reikna út ljósertingarstuðulinn (PIF) eða með því að reikna út meðaláhrif ljóss (MPE),

— samþykktarviðmiðun, samskeiða samanburður með leysi:

— algildur lífvænleiki (ljósþéttni NR-útdráttar) ágeislaðra og óágeislaðra frumna,

— rannsóknarsöguleg gögn um neikvæðan samanburð og samanburð með leysi; meðalgildi og staðalfrávik,

— samþykktarviðmiðanir fyrir prófun; samskeiða, jákvæður samanburður,

— IC_{50} (+ ágeislun) og IC_{50} (– ágeislun) og ljósertingarstuðull (PIF)/meðaláhrif ljóss (MPE) fyrir jákvæð samanburðaríðefni,

— rannsóknarsöguleg gögn um íðefnið fyrir jákvæða samanburðinn: IC_{50} (+ ágeislun) og IC_{50} (– ágeislun) og ljósertingarstuðull (PIF)/meðaláhrif ljóss (MPE), meðalgildi og staðalfrávik.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Lovell W.W., (1993) A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. Toxicology In Vitro 7, bls. 95-102.

2) Santamaria, L. and Prino, G., (1972) List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. bls. XI-XXXV.

3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D., (1994) In vitro phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, bls. 314-348.

4) Spikes, J.D., (1989) Photosensitisation. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, bls. 79-110.

5) OECD, (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 7 "Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water" Environment Directorate, OECD, Paris.

6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A., (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, bls. 793-796.

7) Anon, (1998) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an in vitro test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, bls. 7-8.

8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P., (1998) The international EU/COLIPA In vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxicology In Vitro 12, bls. 305-327.

9) OECD, (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A., (1985) Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, bls. 119-124.

11) Hay, R.J., (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, bls. 225-237.

12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A., (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, bls. 515-530.

13) Tyrrell R.M., Pidoux M., (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, bls. 1825-1829.

14) ISO 10977., (1993) Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

16) ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. bls. 18.

17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U., (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union Directive 76/768/EEC, in the in vitro 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, bls. 679-708.

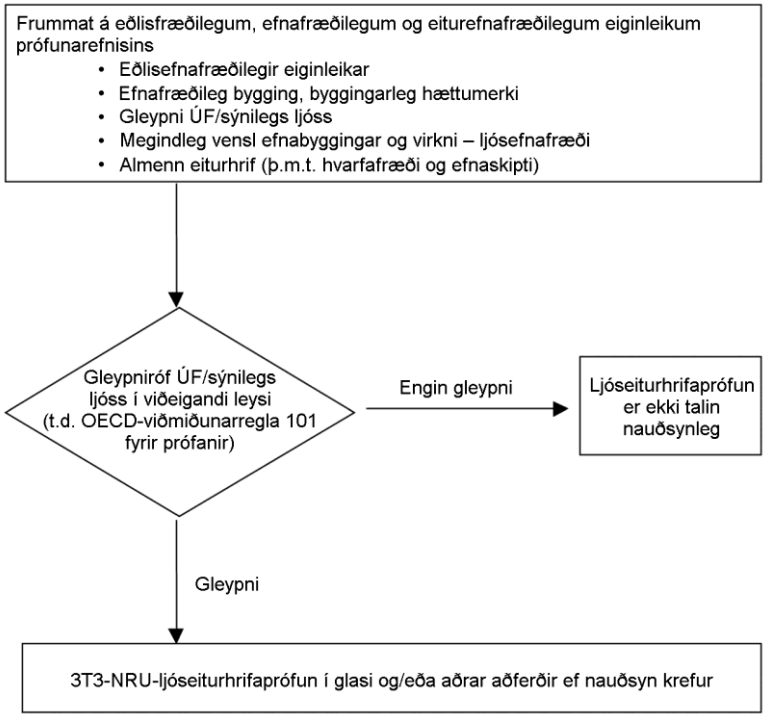
18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J., (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, bls. 127-138.

19) Holzhütter, H.G., (1997) A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, bls. 445-462.

20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

1. viðbætir

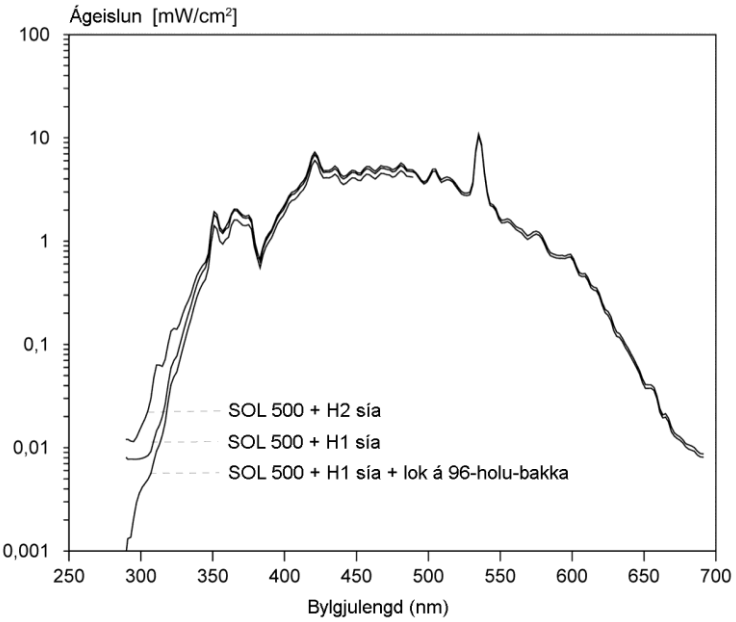
Hlutverk 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófunar í raðprófun á ljóseiturhrifum íðefna



2. viðbætir

Mynd 1

Afldreifing litrófsins frá síuðum sólarhermi



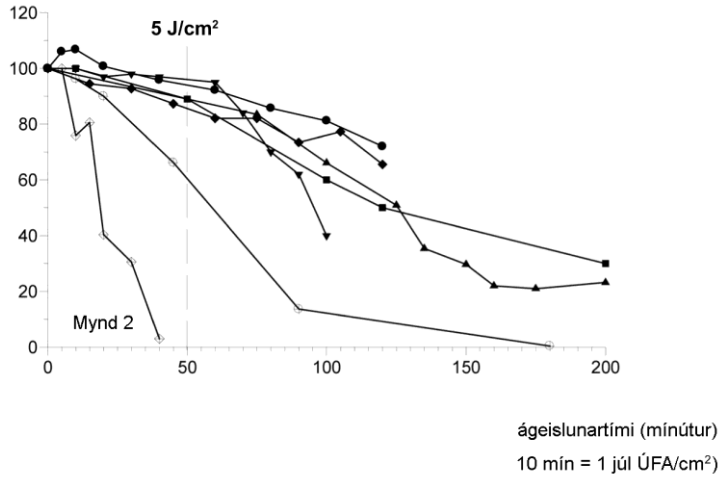
(sjá aðra málsgrein liðar 1.4.1.5)

Mynd 1 sýnir dæmi um viðunandi rófdreifingu ágeislunarstyrks síaðs sólarhermis. Dæmið er af efnabætta málmhalíðgjafanum sem var notaður í fullgildingarrannsókninni á 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófuninni (6., 8. og 17. heimild). Áhrifin af tveimur mismunandi síum og viðbótarsíunaráhrif loksins af 96-holu-frumuræktarbakkanum eru sýnd. H2-sían var aðeins notuð með prófunarkerfum sem þola meira magn af ÚFB (prófun með húðlíkani og rauðalosljósprófun á rauðum blóðkornum (e. *red blood cell photo-haemolysis test*). Í 3T3-NRU-ljóseiturhrifaprófuninni var H1-sían notuð. Myndin sýnir að viðbótarsíunaráhrif bakkaloksins koma aðallega fram á ÚFB-sviðinu, en þó er eftir nægileg ÚFB-geislun í ágeislunarrófinu til að örva íðefni með mestu gleypnina á ÚFB-sviðinu, líkt og amíódarón (sjá töflu 1).

Mynd 2

Geislunarnæmi Balb/c-3T3-frumna (eins og það er mælt á ÚFA-sviðinu)

Lífvænleiki frumna (% upptöku á líflitnum hlutlausum rauðum (e. *Neutral Red*) hjá samanburðarræktunum sem voru hafðar í myrkri)



(sjá liði 1.4.1.5.2 (aðra mgr.), 1.4.2.2.1 og 1.4.2.2.2)

Næmi Balb/c-3T3-frumna fyrir ágeislun með sólarherminum, sem var notaður í fullgildingarrannsókninni á 3T3- NRU-ljóseiturhrifaprófuninni, eins og það mældist á ÚFA-sviðinu. Myndin sýnir niðurstöðurnar sem fengust á sjö mismunandi rannsóknarstofum úr forrannsókninni á undan fullgildingarrannsókninni (1. heimild). Ferlarnir tveir með opnu táknunum voru fengnir með gömlum frumum (mikill fjöldi umsáninga) sem þurfti að skipta út fyrir nýja frumustofna en ferlarnir með feitletruðu táknunum sýna frumur með viðunandi ágeislunarþol.

Frá þessum gögnum var leitt út að stærsti ágeislunarskammturinn, sem ekki væri frumudrepandi, væri 5 J/cm^2 (lóðrétt, brotin lína). Lárétta, brotna línan sýnir að auki hámark viðunandi ágeislunaráhrifa sem um getur í lið 1.4.2.2.

B.42. **HÚÐNÆMING: EITLAGREINING**

1. **AÐFERÐ**

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 429 um prófanir (2002)

1.1. INNGANGUR

Eitlagreining (e. *Local Lymph Node Assay* (LLNA)) hefur hlotið fullgildingu og viðurkenningu sem nægir til þess að hún er tekin upp sem ný aðferð (1.–3. heimild). Þetta er önnur aðferðin til að meta húðnæmingarmátt íðefna hjá dýrum. Í fyrri aðferðinni (B.6) eru notaðar prófanir á naggrísum, einkum hámörkunarprófun á naggrísum og Buehlers-prófun (4. heimild).

Eitlagreiningin er staðgönguaðferð til að sanngreina húðnæmandi íðefni og til að staðfesta að tiltekin íðefni búi ekki yfir umtalsverðum mætti til að orsaka húðnæmingu. Þetta þýðir ekki endilega að alltaf skuli nota eitlagreininguna í stað prófunar á naggrísum heldur að greiningin sé jafngild naggrísaprófuninni og að hana megi nota sem staðgönguaðferð í tilvikum þar sem jákvæðar eða neikvæðar niðurstöður þurfa að jafnaði ekki frekari staðfestingar við.

Eitlagreiningin hefur vissa kosti, bæði að því er varðar vísindalegar framfarir og velferð dýra. Hún er notuð til að rannsaka örvunarfasa húðnæmingar og veitir megindlegar upplýsingar sem henta til að meta tengsl svörunar og skammtastærðar. Nánari upplýsingar um fullgildingu eitlagreiningar og yfirlit yfir það starf sem tengist henni hafa verið birt (5.–8. heimild). Auk þess skal tekið fram að vægir eða hóflegir næmar, sem er mælt með sem jákvæðum samanburðaríðefnum fyrir prófanir á naggrísum, henta einnig vel þegar eitlagreining er notuð (6., 8. og 9. heimild).

Eitlagreining er aðferð til greiningar í lífi og þar af leiðandi útilokar hún ekki að dýr séu notuð við mat á næmingu við snertingu. Hún gefur þó möguleika á því að fækka dýrunum sem nota þarf í þessum tilgangi. Auk þess býður eitlagreiningin upp á verulega framför í meðferð dýra við prófanir á næmingu við snertingu. Eitlagreiningin byggist á athugunum á ónæmisfræðilegum fyrirbærum sem eru örvuð með íðefnum í örvunarfasa næmingar. Ólíkt því sem á við um prófanir á naggrísum er ekki þörf á því við eitlagreiningu að kalla fram áreitisörvaða húðofnæmissvörun. Ekki þarf heldur að nota ónæmisglæði við eitlagreiningu eins og gera þarf við hámörkunarprófun á naggrísum. Eitlagreining minnkar því þau óþægindi sem dýrin þurfa að þola. Þrátt fyrir kosti eitlagreiningar fram yfir hefðbundnar prófanir á naggrísum skal þó viðurkennt að hún hefur vissar takmarkanir sem geta gert það nauðsynlegt að nota hefðbundnar prófanir á naggrísum (t.d. vegna falsneikvæðra niðurstaðna úr eitlagreiningu með tilteknum málmum og falsjákvæðra niðurstaðna með tilteknum húðertingarefnum)(10. heimild).

Sjá einnig inngang að B-hluta.

1.2. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Eitlagreiningin byggist á þeirri grundvallarreglu að næmar valdi fjölgun eitilfrumna í dreneitlinum (e. *draining lymph node*) við staðinn þar sem íðefnin voru borin á. Þessi fjölgun er í réttu hlutfalli við skammtinn sem er notaður (og mátt ofnæmisvaldsins) og er einföld leið til að fá hlutlæga og megindlega mælingu á næmingunni. Með eitlagreiningunni er kleift að meta þessa fjölgun sem tengsl svörunar og skammtastærðar þar sem fjölgunin í prófunarhópunum er borin saman við fjölgunina í samanburðarhópunum sem fá eingöngu burðarefni. Hlutfallið á milli fjölgunarinnar í meðferðarhópunum og í samanburðarhópunum sem fá eingöngu burðarefni, svokallaður örvunarstuðull (e. *stimulation index*), er ákvarðað og verður að vera a.m.k. þrír til þess að prófunarefnið verði skoðað nánar sem hugsanlegur húðnæmir. Aðferðirnar, sem hér er lýst, byggjast á því að notuð sé merking með geislavirku efni til að mæla fjölgun frumna. Þó er hægt að nota aðra endapunkta fyrir mat á fjölgun, að því tilskildu að rökstuðningur sé fyrir því og nægilegur vísindagrunnur, þ.m.t. fullnægjandi vísanir í heimildir og lýsing á aðferðinni.

1.3. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.3.1. **Undirbúningur**

1.3.1.1. *Aðbúnaður og fóðrun*

Dýrin skulu höfð hvert í sínu búri. Hitastigið í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 ºC). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni.

1.3.1.2. *Dýrin undirbúin*

Dýrin eru valin af handahófi, merkt svo að þau þekkist í sundur (þó ekki með eyrnamerkingu af neinu tagi) og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en skammtagjöf hefst til að þau venjist umhverfis-aðstæðum á rannsóknarstofunni. Áður en meðferð hefst eru öll dýrin rannsökuð til að ganga úr skugga um að þau hafi engar sýnilegar húðskemmdir.

1.3.2. Prófunarskilyrði

1.3.2.1. *Tilraunadýr*

Mýs eru heppilegasta tegundin fyrir þessa prófun. Tilraunadýrin skulu vera ungar, fullvaxnar kvenmýs af stofni CBA/Ca eða CBA/J sem eru eibærar og ekki með fangi. Við upphaf rannsóknarinnar ættu dýrin að vera 8–12 vikna gömul og breytileiki í þyngd þeirra ætti að vera í lágmarki og ekki víkja meira en 20% frá meðalþyngdinni. Nota má aðra stofna og karldýr þegar nógum gögnum hefur verið safnað sem staðfesta að ekki sé um að ræða verulegan mun á svörun eftir stofni og/eða kynjum í eitlagreiningunni.

1.3.2.2. *Áreiðanleikakönnun*

Jákvæðum samanburði er beitt til að sýna fram á tilhlýðilegt nothæfi greiningarinnar og færni rannsóknar-stofunnar til að framkvæma greininguna á árangursríkan hátt. Jákvæði samanburðurinn á að veita jákvæða svörun í eitlagreiningu á því váhrifastigi sem búist er við að kalli fram hækkun á örvunarstuðlinum (SI) >3 umfram neikvæða samanburðarhópinn. Velja skal skammt fyrir jákvæða samanburðinn þannig að örvun sé greinileg en ekki óhóflega mikil. Efni, sem mælt er með, eru hexýlsinnamínaldehýð (CAS-nr. 101-86-0, EINECS-nr. 202-983-3) og merkaptóbensóþíasól (CAS-nr. 149-30-4, EINECS-nr. 205-736-8). Við vissar aðstæður má nota önnur samanburðarefni sem uppfylla áðurgreindar viðmiðanir enda séu færð gild rök fyrir því. Þótt að jafnaði sé nauðsynlegt að hafa jákvæðan samanburðarhóp í hverri greiningu geta komið upp aðstæður þar sem rannsóknarstofurnar hafa tiltæk rannsóknarsöguleg gögn sem sýna samkvæmni í fullnægjandi svörun sem spannar sex mánaða tímabil eða lengri tíma. Við þessar aðstæður getur hentað að láta prófanir með jákvæðum samanburði fara fram með lengra millibili en þó ekki sjaldnar en á sex mánaða fresti. Þótt prófa eigi jákvæða samanburðarefnið í burðarefni sem vitað er að kallar stöðugt fram sömu svörun (t.d. í aseton-ólífuolíublöndu) geta komið upp tilteknar aðstæður í tengslum við reglusetningu þar sem prófanir í óstöðluðu burðarefni (samsetningu sem skiptir máli klínískt eða efnafræðilega) eru einnig nauðsynlegar. Við slíkar aðstæður er rétt að prófun fari fram á hugsanlegri milliverkun jákvæðs samanburðarefnis og þessa óhefðbundna burðarefnis.

1.3.2.3. *Fjöldi dýra, skammtastærðir og val burðarefnis*

Nota skal a.m.k. fjögur dýr fyrir hvern skammtahóp og a.m.k. þrjá mismunandi styrkleika af prófunar-efninu, svo og neikvæðan samanburðarhóp sem fær einungis meðferð með burðarefni prófunarefnisins, og, eftir því sem við á, jákvæðan samanburðarhóp. Í þeim tilvikum þar sem afla á gagna um einstök dýr skulu vera a.m.k. fimm dýr í hverjum skammtahópi. Dýrin í samanburðarhópunum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og meðferð og dýrin í meðferðarhópunum að öðru leyti en því að þau fyrrnefndu fá ekki meðferð með prófunarefninu.

Val á skammtastærðum og burðarefni skal byggjast á ráðleggingum sem settar eru fram í 1. heimild. Skammtar eru valdir úr styrkleikaröðinni 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5% o.s.frv. Taka skal tillit til fyrirliggjandi gagna um bráð eiturhrif og húðertingu, ef þau gögn eru tiltæk, við valið á styrkleikunum þremur svo að mestu váhrifin verði við mesta styrkinn en komist verði hjá altækum eiturhrifum og óhóflegri húðertingu (2. og 11. heimild).

Velja skal burðarefni með það að markmiði að hámarka prófunarstyrkleikana og leysnina og fá jafnframt lausn/svifblöndu sem hentar vel fyrir áburð prófunarefnisins. Burðarefni, sem mælt er með, eru þessi og í þessari forgangsröð: aseton-ólífuolíublanda (í rúmmálshlutfallinu 4:1), dímetýlformamíð, metýletýlketón, própýlenglýkól og dímetýlsúlfoxíð (2. og 10. heimild) en nota má önnur efni ef færð eru fullnægjandi, vísindaleg rök fyrir því. Í sumum tilvikum getur verið nauðsynlegt að nota leysi, sem skiptir máli út frá klínískri skírskotun, eða efnablönduna, sem prófunarefnið er selt í á markaði, sem viðbótarsamanburð. Sérstaklega þarf að sjá til þess að vatnssækin efni, sem halda húðinni votri og renna ekki strax af, séu hluti af burðarefninu. Þess vegna ber að varast að nota burðarefni sem eru eingöngu vatnskennd.

1.3.3. **Prófunaraðferð**

1.3.3.1. *Tilraunaáætlun*

Tilraunaáætlunin fyrir greininguna er sem hér segir:

1. dagur:

Hvert dýr skal vegið og þyngd þess skráð. Borin eru 25 µl af hæfilega þynntu prófunarefninu, burðarefninu eingöngu eða jákvæða samanburðinum (eftir því sem við á) aftan á bæði eyrun.

2. og 3. dagur:

Borið er aftur á dýrin eins og á 1. degi.

4. og 5. dagur:

Engin meðferð.

6. dagur:

Þyngd hvers dýrs skal skráð. Sprautað er 250 µl af fosfatjafnaðri saltlausn (PBS), sem inniheldur 20 µCi (7,4 e + 8 Bq) af ^{3}H-metýltýmidíni, í rófubláæð allra prófunar- og samanburðarmúsa. Að öðrum kosti er 250 µl af fosfatjafnaðri saltlausn (PBS), sem inniheldur 2 µCi (7,4 e +7 Bq) af ^{125}I-joðdeoxýúridíni og 10^{-5} M af flúordeoxýúridíni, sprautað í rófubláæð allra músanna.

Fimm tímum síðar eru dýrin aflífuð. Dreneitlarnir eru skornir úr hvoru eyra allra músanna og hópaðir (e. *pooled*) í fosfatjafnaðri saltlausn fyrir hvern tilraunahóp (aðferð með hópuðum meðferðarhópi) að öðrum kosti er hægt að skera eitlapör úr einstökum dýrum og hópa þau í fosfatjafnaðri saltlausn fyrir hvert dýr um sig (stakdýrsaðferð). Nákvæmar upplýsingar og skýringarmyndir af greiningu og krufningu eitla er að finna í I. viðauka í 10. heimild.

1.3.3.2. *Tilreiðsla frumusviflausna*

Ein svifblanda með eitilfrumum, annaðhvort úr hópuðu meðferðarhópunum eða tvíhliða úr einstökum dýrum, er búin til með vægri, vélrænni aðgreiningu gegnum 200 µm möskva net úr ryðfríu stáli. Eitilfrumurnar eru þvegnar tvisvar með umframmagni af fosfatjafnaðri saltlausn og felldar út með 5% tríklórediksýru við 4 °C í 18 klst. (2. heimild). Annaðhvort er endurútbúin svifblanda af botnfallinu í 1 ml af tríklórediksýru og flutt yfir í sindurmælingaglas, sem inniheldur 10 ml af sindurvökva fyrir ^{3}H-talningu, eða flutt beint í gammatalningarmæliglas fyrir ^{125}I-talningu.

1.3.3.3. *Ákvörðun á frumufjölgun (upptekin geislavirkni)*

Upptekið ^{3}H-metýltýmidín er mælt með ß-sindurtalningu sem sundrun á mínútu (e. *disintegrations per minute* (DPM)). Upptekið ^{125}I-joðdeoxyúridín er mælt með ^{125}I-talningu og er einnig tilgreint sem sundrun á mínútu. Upptakan er gefin upp sem sundrun á mínútu á hvern meðferðarhóp (hópunaraðferð) eða sundrun á mínútu á hvert dýr (stakdýrsaðferð), eftir því hvor aðferðin er notuð.

1.3.3.4. *Athuganir*

1.3.3.4.1. Klínískar athuganir

Dýrin skulu skoðuð gaumgæfilega einu sinni á dag til að kanna hvort sjá megi einhver klínísk merki hjá dýrunum, annaðhvort um staðbundna ertingu á áburðarsvæðinu eða um altæk eiturhrif. Skrá skal allar athuganir kerfisbundið og halda sérstaka skrá fyrir hvert dýr.

1.3.3.4.2. Líkamsþyngd

Eins og tilgreint er í lið 1.3.3.1 skal vigta hvert dýr við upphaf prófunar og við aflífun samkvæmt áætlun.

1.3.4. **Útreikningur á niðurstöðum**

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem örvunarstuðull (SI). Þegar hópunaraðferðin er notuð fæst örvunarstuðullinn með því að deila í hópaða, upptekna geislavirkni í hverjum meðferðarhópi með upptökunni hjá hópuðum samanburðarhópi sem fær eingöngu burðarefni, þannig fæst meðalörvunarstuðull. Þegar stakdýrsaðferðin er notuð fæst örvunarstuðullinn með því að deila í meðalsundrun á mínútu/dýr í hverjum prófunarefnishópi og í jákvæða samanburðarhópnum með meðalsundrun á mínútu/dýr í samanburðarhópnum sem fær leysi eða burðarefni. Meðalörvunarstuðullinn fyrir samanburðarhópinn, sem fær burðarefni, er þá 1.

Þegar örvunarstuðullinn er reiknaður út með stakdýrsaðferðinni er unnt að koma við tölfræðilegri greiningu á gögnunum. Þegar velja skal viðeigandi aðferð fyrir tölfræðilega greiningu þarf rannsakandinn að vera meðvitaður um hugsanlegan ójöfnuð í dreifni og önnur skyld vandamál sem kunna að útheimta umbreytingu gagna eða tölfræðilega greiningu án breytna. Fullnægjandi aðferð til að túlka gögnin er að meta öll einstaklingsgögn úr meðferðarhópum og úr samanburðarhópum sem fá eingöngu burðarefni og reikna út frá þeim best aðlagaða skammta-svörunarferillinn, að teknu tilliti til öryggismarka (8., 12. og 13. heimild). Rannsakandi þarf þó að hafa varann á gagnvart hugsanlegum „einförum“ í svörum hjá einstökum dýrum í hópi en slíkt getur gert það að verkum að nota þarf aðra mælikvarða á svörun (t.d. miðgildi í stað meðaltals) eða útiloka einfarann.

Ákvörðunarferlið, sem tengist jákvæðri svörun, útheimtir örvunarstuðul ≥ 3, að tekið sé tillit til tengsla skammtastærðar og svörunar og, eftir því sem við á, tölfræðilega marktækni (3., 6., 8., 12. og 14. heimild).

Ef nauðsynlegt reynist að skýra fengnar niðurstöður skal huga að ýmsum eiginleikum prófunarefnisins, þ.m.t. hvort það er skylt þekktum húðnæmum að byggingu, hvort það veldur óhóflegri húðertingu og hvert er eðli tengslanna sem fram koma milli skammts og svörunar. Fjallað er ítarlega um þetta og önnur atriði annars staðar (7. heimild).

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu þar sem sýnd eru meðalgildi og einstök gildi fyrir sundrun á mínútu og örvunarstuðlar fyrir hvern skammtahóp (þ.m.t. fyrir samanburðarhóp sem fær burðarefni).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— auðkennisgögn (t.d. CAS-númer, liggi það fyrir, uppruni, hreinleiki, þekkt óhreinindi, lotunúmer),

— eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. rokgirni, stöðugleiki og leysni),

— ef um blöndu er að ræða: samsetning og innbyrðis hlutfall efnisþátta í hundraðshlutum.

Burðarefni:

— auðkennisgögn (hreinleiki, styrkur (ef við á) og rúmmál efnis sem er notað),

— rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

— músastofninn sem er notaður,

— örverufræðilegt ástand dýranna, ef það er þekkt,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um undirbúning prófunarefnisins og hvernig það er borið á,

— rök fyrir vali á skammtastærðum, þ.m.t. niðurstöður úr skammtastærðarrannsókn hafi hún farið fram, þeir styrkleikar burðarefnis og prófunarefnis sem eru notaðir og heildarmagn efnis sem er borið á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns (þ.m.t. tegund og uppruni fóðurs og uppruni vatns).

Áreiðanleikakönnun:

— samantekt á niðurstöðum síðustu áreiðanleikakönnunar, þ.m.t. upplýsingar um efni, styrk og burðarefni sem er notað,

— samskeiða og/eða rannsóknarsöguleg gögn um jákvæðan og neikvæðan samanburð fyrir prófunarstofuna.

Niðurstöður:

— þyngd hvers dýrs við upphaf skömmtunar og við aflífun samkvæmt áætlun,

— tafla yfir gildi fyrir meðalsundrun á mínútu (hópunaraðferð) og gildi sundrunar á mínútu fyrir einstök dýr (stakdýrsaðferð), svo og dreifisvið gilda fyrir báðar aðferðir og örvunarstuðlar fyrir hvern skammtahóp (þ.m.t. samanburðarhópur sem fær burðarefni eingöngu),

— tölfræðileg greining ef við á,

— tíminn þegar eiturhrifa varð vart og hvernig þau þróast, þ.m.t. húðerting, ef einhver er, á áburðarsvæðinu, fyrir hvert dýr.

Umfjöllun um niðurstöður.

— Stuttar athugasemdir um niðurstöður, greining á tengslum skammta og svörunar og tölfræðileg greining, eftir því sem við á, með ályktun um það hvort prófunarefnið skuli teljast húðnæmir.

4. **HEIMILDIR**

1) Kimber, I. and Basketter, D.A., (1992) The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, bls. 165-169.

2) Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, bls. 13-31.

3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L., (1998) Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53, bls. 563-79.

4) Prófunaraðferð B.6.

5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A., (1996) The local lymph node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 34, bls. 999-1002.

6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E., (1996) The local lymph node assay-A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology, 34, bls. 985-997.

7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I., (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food and Chemical Toxicology. 36, bls. 327-33.

8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H., (2000) A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employement of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicology, 146, bls. 49-59.

9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I., (1998) Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. Journal of Applied Toxicology, 18, bls. 281-4.

10) National Institute of Environmental Health Sciences, (1999) The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (http://iccvam.niehs.nih.gov).

11) Prófunaraðferð B.4.

12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A., (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. Food and Chemical Toxicology, 31, bls. 63-67.

13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I., (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. J. Appl. Toxicology, 19, bls. 261-266.

14) Basketter D.A., Blaikie L., Derman R.J., Kimber I., Ryan C.A., Gerberick G.F., Harvey P., Evans P., White I.R. and Rycroft R.T.G., (2000) Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. Contact Dermatitis 42, bls. 344-48.

B.43. RANNSÓKN Á TAUGAEITURHRIFUM HJÁ NAGDÝRUM

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 424 um prófanir (1997).

Þessi prófunaraðferð var hönnuð til að afla nauðsynlegra upplýsinga til að staðfesta eða lýsa nánar hugsanlegum taugaeiturhrifum af völdum íðefna hjá fullvöxnum dýrum. Aðferðina má annaðhvort nota ásamt fyrirliggjandi prófunaraðferðum við rannsóknir á eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf eða beita henni sem sjálfstæðri rannsókn. Mælt er með því að leiðbeiningaskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um prófunaráætlanir og aðferðir varðandi rannsóknir á taugaeiturhrifum (1. heimild) sé haft til hliðsjónar við hönnun rannsókna sem byggjast á þessari prófunaraðferð. Það er einkum mikilvægt ef áformað er að gera breytingar á athugunum og prófunaraðferðum sem mælt er með að sé almennt beitt með þessari aðferð. Leiðbeiningaskjalið er samið í því skyni að auðvelda val á öðrum prófunaraðferðum til að nota við sérstakar aðstæður.

Þessi aðferð tekur ekki til mats á áhrifum taugaeiturhrifa á þroskun.

1.1. INNGANGUR

Við mat og ákvörðun á eitureiginleikum íðefna er mikilvægt að skoða mátt íðefnisins til að framkalla taugaeiturhrif. Prófunaraðferðin fyrir altæk eiturhrif við endurtekna skammtagjöf felur nú þegar í sér athuganir þar sem hugsanleg taugaeiturhrif eru skimuð. Þessa prófunaraðferð má nota til að hanna rannsókn í því skyni að afla frekari upplýsinga um, eða staðfesta, taugaeiturhrif sem koma fram í rannsóknum á altækum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf. Athuganir á hugsanlegum taugaeiturhrifum tiltekinna flokka íðefna geta þó bent til þess að heppilegra sé að ákvarða þau beint með þessari aðferð án þess að leggja til grundvallar áður fengnar vísbendingar um hugsanleg eiturhrif úr rannsóknum á altækum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf. Slíkar athuganir fela t.d. í sér:

— athugun á taugafræðilegum einkennum eða taugameinafræðilegum skemmdum í rannsóknum á eiturhrifum, öðrum en rannsóknum á altækum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf, eða

— skyldleika í byggingu eða aðrar upplýsingar sem tengja efnið við efni sem vitað er að veldur taugaeiturhrifum.

Auk þess geta verið önnur tilvik þar sem þessi prófunaraðferð hentar vel, sjá nánar í 1. heimild.

Þessi aðferð hefur verið þróuð þannig að hægt sé að laga hana að sérstökum þörfum á því að staðfesta sértæk, vefjameinafræðileg og atferlisleg taugaeiturhrif íðefnis svo og að lýsa taugaeiturhrifasvörunum og greina stærð þeirra.

Áður voru taugaeiturhrif lögð að jöfnu við taugakvilla sem fela í sér taugameinafræðilegar skemmdir eða taugafræðilega starfstruflun, s.s. flog, lömun eða skjálfta. Þótt taugakvillar gefi mikilvæga vísbendingu um taugaeiturhrif er nú ljóst að til eru mörg önnur merki um eiturhrif í taugakerfinu (t.d. tap á samræmi hreyfinga, misbrestur á starfsemi skynfæra, náms- og minnisörðugleikar) sem koma ekki alltaf fram í rannsóknum á taugakvillum eða annars konar rannsóknum.

Þessi aðferð við prófun á taugaeiturhrifum er ætluð til greiningar á mikilvægum taugaatferlis- og taugameinafræðileg áhrifum hjá fullvöxnum nagdýrum. Þótt atferlistengd áhrif geti endurspeglað skaðleg áhrif á lífverur, jafnvel þótt ekki sé um formfræðilegar breytingar að ræða, eru ekki allar breytingar á atferli bundnar taugakerfinu. Þess vegna skulu allar breytingar, sem koma fram, metnar í tengslum við samsvarandi vefjameinafræðileg, blóðfræðileg eða lífefnafræðileg gögn, svo og gögn um aðrar tegundir altækra eiturhrifa. Prófanirnar, sem gert er ráð fyrir í þessari aðferð og eiga að lýsa einkennum taugaeiturhrifasvörunar og greina stærð hennar, fela í sér sérstök, vefjameinafræðileg og atferlisleg verkferli sem hægt er að styðja enn frekar með raflífefnafræðilegum og/eða lífefnafræðilegum rannsóknum (1.–4. heimild).

Efni, sem hafa eituráhrif á taugar, geta verkað á marga staði í taugakerfinu og með margs konar gangvirkjum. Þar eð engin einföld röð prófana er til þar sem hægt er að meta vandlega taugaeiturhrifamátt allra efna getur verið nauðsynlegt að nota aðrar prófanir í lífi eða í glasi sem eru sérstaklega gerðar fyrir þá tegund taugareiturhrifa sem hafa komið í ljós eða sem gert er ráð fyrir.

Einnig er hægt að nota þessa prófunaraðferð í tengslum við leiðbeiningarnar sem settar eru fram í leiðbeiningaskjali Efnahags- og framfarastofnunarinnar um prófunaráætlanir og aðferðir varðandi taugaeiturhrif (1. heimild) til að hanna rannsóknir sem er ætlað að lýsa frekar eða auka næmleika í megindlegri ákvörðun á skammtasvörun með það fyrir augum að geta betur metið mörkin um engin

merkjanleg, skaðleg áhrif eða færa sönnur á þekktar eða hugsanlegar hættur sem stafa af íðefninu. Til dæmis má hanna rannsóknir með það fyrir augum að sanngreina og meta gangvirki taugaeiturhrifa eða auka við gögn sem liggja þegar fyrir úr taugaatferlislegum og taugameinafræðilegum grunnathugunum. Slíkar rannsóknir þurfa ekki að gefa sömu niðurstöður og fengjust með því að nota þær stöðluðu aðferðir sem mælt er með í þessari aðferð ef slík gögn eru þegar fyrirliggjandi og eru ekki talin nauðsynleg fyrir túlkun á niðurstöðum rannsóknarinnar.

Þessi rannsókn á taugaeiturhrifum, ein sér eða ásamt öðrum, veitir upplýsingar sem geta:

— gefið til kynna hvort taugakerfið hefur orðið fyrir varanlegum áhrifum af efninu sem er til prófunar eða áhrifum sem ganga til baka,

— lýst betur þeim breytingum í taugakerfinu sem tengjast váhrifum frá efninu og aukið skilning á því gangvirki sem liggur þessu til grundvallar,

— ákvarðað tengsl svörunar, tíma og skammtastærðar með það fyrir augum að finna mörkin um engin merkjanleg, skaðleg áhrif (sem nota má til þess að ákvarða öryggisviðmiðanir fyrir íðefnið).

Við prófun með þessari aðferð er prófunarefnið gefið um munn. Aðrar íkomuleiðir (t.d. um húð eða við innöndun) geta verið heppilegri og þá getur þurft að breyta þeim verkferlum sem mælt er með. Þegar velja á íkomuleið skal huga að upplýsingum um váhrifamyndina, að því er varðar menn, og fyrirliggjandi eiturefnafræðilegum og hvarfafræðilegum upplýsingum.

1.2. SKILGREININGAR

Skaðleg áhrif: meðferðartengd breyting frá grunnviðmiðun sem minnkar hæfni lífveru til að lifa af, fjölga sér eða laga sig að umhverfinu.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er gefið. Skammtur er gefinn upp sem þyngd (g, mg) eða sem þyngd prófunarefnis á hverja þyngdareiningu tilraunadýrs (t.d. mg/kg) eða sem fastur styrkur í fóðri (milljónarhlutar).

Skömmtun: almennt hugtak sem er notað um skammt, hversu oft hann er gefinn og hve lengi.

Taugaeiturhrif: skaðleg breyting í byggingu eða starfsemi taugakerfisins sem stafar af váhrifum frá efnafræðilegum, líffræðilegum eða eðlisfræðilegum áhrifavaldi.

Efni sem hefur eituráhrif á taugar: efnafræðilegur, líffræðilegur eða eðlisfræðilegur áhrifavaldur sem getur valdið taugaeiturhrifum.

NOAEL: skammstöfun á „no observed adverse effect level“ sem merkir „mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif“, þ.e. stærsti skammturinn sem veldur engum merkjanlegum, skaðlegum, meðferðartengdum áhrifum.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið er gefið um munn og notaðir eru nokkrir hópar nagdýra sem fá nokkra misstóra skammta. Yfirleitt er nauðsynlegt að endurtaka skammtagjöf og skömmtunaráætlunin getur náð yfir 28 daga en 90 daga við hálflangvinn eiturhrif og eitt ár eða lengur við langvinn eiturhrif. Verkferlin, sem lýst er fyrir þessa aðferð, má einnig nota við rannsókn á bráðum taugaeiturhrifum. Dýrin eru prófuð til að unnt sé að greina eða lýsa atferlistengdum og/eða taugafræðilegum afbrigðileika. Á hverju athugunartímabili er lagt mat á ýmiss konar atferli sem eiturefni, sem hafa áhrif á taugar, geta haft áhrif á. Við lok prófunarinnar er undirhópur dýra úr hverjum hópi og af hvoru kyni settur í gegnflæði á staðnum og sýni úr heila, mænu og úttaugum tekin og rannsökuð.

Þegar rannsóknin er gerð sem sjálfstæð rannsókn til að skima eftir taugaeiturhrifum eða til að lýsa eðli taugaeiturhrifa er hægt að nota dýr úr öllum hópum, sem eru ekki settir í gegnflæði og síðari, vefjameinafræðilegar rannsóknir (sjá töflu 1), til sértækra rannsókna með taugaatferlislegum, taugameina-fræðilegum, taugaefnafræðilegum eða raflífeðlisfræðilegum verkferlum sem geta aukið við gögnin sem fást með þeim staðalrannsóknum sem þessi aðferð útheimtir (1. heimild). Þessi viðbótarverkferli geta verið mjög gagnleg þegar reynsluathuganir eða áhrifin, sem vænst er, benda til þess að taugaeiturhrif viðkomandi íðefnis séu af sérstakri tegund eða beinist að sérstöku marklíffæri Að öðrum kosti er hægt að nota dýrin, sem eftir verða, við möt eins og þau sem gert er ráð fyrir í prófunaraðferðunum fyrir rannsóknir á eiturhrifum hjá nagdýrum sem fá endurtekna skammta.

Þegar verkferlin samkvæmt þessari prófunaraðferð eru sameinuð verkferlum fyrir aðrar prófunaraðferðir þarf að hafa nægilega mörg dýr til að unnt sé að uppfylla kröfurnar um athuganir í báðum rannsóknum.

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Val á dýrategund**

Rottur eru ákjósanlegasta nagdýrategundin þótt nota megi aðrar tegundir nagdýra ef færð eru rök fyrir því. Nota skal ung, heilbrigð, fullvaxin dýr af algengum rannsóknarstofustofnum. Kvendýrin skulu vera eibær og ekki með fangi. Skammtagjöf skal að jafnaði hefjast eins fljótt og hægt er eftir fráfærur, helst ekki síðar en við sex vikna aldur og í öllum tilvikum áður en þau ná níu vikna aldri. Ef þessi rannsókn er sameinuð öðrum rannsóknum getur þó þurft að aðlaga þessar kröfur um aldursmörk. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalþyngd hvors kyns um sig. Ef rannsókn með endurteknum skömmtum í skamman tíma er undanfari langtímarannsóknar skal nota dýr af sama stofni og uppruna í báðum rannsóknunum.

1.4.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 (±3) ºC. Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Halda skal miklum, breytilegum hávaða í lágmarki. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Val á fóðri kann að ráðast af því að hægt sé að blanda prófunarefni í fóðrið á viðeigandi hátt þegar það er gefið með þessari aðferð. Dýrin má hafa hvert í sínu búri eða litla hópa af sama kyni saman í búri.

1.4.3. **Dýrin undirbúin**

Heilbrigðum, ungum dýrum er slembiraðað í meðferðar- og samanburðarhópana. Koma skal búrunum þannig fyrir að staðsetning þeirra hafi sem minnst áhrif. Dýrin eru auðkennd, hvert um sig, á einkvæman hátt og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga fyrir rannsóknina til að þau venjist umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

1.4.4. **Íkomuleið og tilreiðsla skammta**

Í þessari prófunaraðferð er sérstaklega gert ráð fyrir að prófunarefnið sé gefið um munn. Gefa má prófunarefni um munn með magaslöngu, í fóðri, drykkjarvatni eða í hylkjum. Nota má aðrar íkomuleiðir (t.d. um húð eða við innöndun) en þá getur þurft að breyta þeim verkferlum sem mælt er með. Þegar velja á íkomuleið skal huga að upplýsingum um váhrifamyndina, að því er varðar menn, og fyrirliggjandi eiturefnafræðilegum og hvarfafræðilegum upplýsingum. Tilgreina skal rök fyrir vali á íkomuleið og einnig þeim breytingum sem þá eru gerðar á verkferlunum sem gert er ráð fyrir í þessari prófunaraðferð.

Ef nauðsyn krefur má leysa prófunarefnið upp eða útbúa úr því svifblöndu í heppilegu burðarefni. Mælt er með því að nota helst lausnir/svifblöndur í vatni en að öðrum kosti lausnir/svifblöndur í olíu (t.d. maísolíu) en að þeim slepptum geta lausnir/svifblöndur með öðrum burðarefnum komið til greina. Eitureiginleikar burðarefnisins verða að vera þekktir. Einnig þarf að hafa í huga eftirfarandi eiginleika burðarefnisins: áhrif burðarefnisins á frásog, dreifingu, efnaskipti eða geymd prófunarefnisins sem kunna að breyta eitureiginleikum þess, svo og áhrif á fóðurát og vatnsdrykkju eða á næringarástand dýranna.

1.5. VERKLAGSREGLUR

1.5.1. **Fjöldi og kyn dýranna**

Ef rannsóknin er sjálfstæð rannsókn skulu vera a.m.k. 20 dýr (10 kvendýr og 10 karldýr) í hverjum skammta- og samanburðarhópi með tilliti til mats á ítarlegum, klínískum og starfrænum athugunum. Að minnsta kosti fimm karldýr og fimm kvendýr, sem valin eru úr þessum 10 karldýrum og 10 kvendýrum, skulu sett í gegnflæði á staðnum og notuð til ítarlegra taugavefjameinafræðilegra rannsókna við lok rannsóknarinnar. Í tilvikum þar sem aðeins takmarkaður fjöldi dýra í tilteknum skammtahópi er skoðaður með tilliti til þess hvort merki sjáist um taugaeiturhrif skal vega og meta hvort taka eigi þessi dýr með í hópinn sem settur er í gegnflæði. Ef rannsóknin fer fram ásamt rannsókn á eiturhrifum við endurtekna skammta verður að nota nægilega mörg dýr til að unnt sé að ná markmiðum beggja rannsóknanna. Lágmarksfjöldi dýra í hverjum hópi fyrir mismunandi samsetningar rannsókna er tilgreindur í töflu 1. Ef áform eru um að aflífa dýr í tilrauninni eða setja upp batahópa til að athuga hvort eiturhrif eftir meðferð ganga til baka, eru varanleg eða síðkomin, eða ef frekari athuganir eru íhugaðar þá skal fjölga tilraunadýrum til að tryggja að dýrin, sem þarf til athugana og vefjameinafræðilegra rannsókna, séu nægilega mörg.

1.5.2. **Meðferðar- og samanburðarhópur**

Almennt skal nota a.m.k. þrjá skammtahópa og samanburðarhóp en ef mat á öðrum gögnum gefur ekki ástæðu til að vænta neinna áhrifa af endurteknum skammti sem er 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag má

framkvæma markprófun. Ef ekki eru til viðeigandi gögn er hægt að gera skammtastærðarrannsókn til að auðvelda ákvörðun á því hvaða skammta skuli nota. Dýrin í samanburðarhópnum skulu fá nákvæmlega sömu meðhöndlun og dýrin í prófunarhópunum að öðru leyti en því að þau fá ekki meðferð með prófunarefninu. Ef burðarefni er notað við gjöf prófunarefnisins skal gefa samanburðarhópnum stærsta skammtinn af burðarefninu sem er notaður.

1.5.3. **Áreiðanleikakönnun**

Rannsóknarstofan, sem framkvæmir rannsóknina, skal leggja fram gögn sem sýna hæfni hennar til að framkvæma rannsóknina og næmi verkferlanna sem eru notuð. Slík gögn skulu færa sönnur á getu til að greina og magngreina, eftir því sem við á, breytingar í hinum ýmsu endapunktum sem mælt er með að verði skoðaðir, s.s. ósjálfráðum merkjum, skynviðbrögðum, gripstyrk og hreyfistarfsemi. Upplýsingar um íðefni, sem valda mismunandi taugaeitursvörunum og sem má nota sem jákvæðan samanburð, er að finna í 2.–9. heimild. Nota má rannsóknarsöguleg gögn ef grunnþættir tilraunaferlisins eru þeir sömu. Mælt er með því að rannsóknarsöguleg gögn séu uppfærð reglulega. Breyti rannsóknarstofan veigamiklum þætti í prófunum eða verkferlum sínum skal hún leggja skal fram ný gögn sem staðfesta áframhaldandi næmi verkferlanna.

1.5.4. **Val á skammtastærðum**

Velja skal skammtastærðir með hliðsjón af öllum tiltækum eldri gögnum um þau eiturhrif og eiturefnahvörf prófunarefnasambandsins eða skyldra efna sem áður hafa komið í ljós. Stærsti skammturinn er valinn með það fyrir augum að hann kalli fram taugaeiturhrif eða skýr, altæk eiturhrif. Eftir það er valin röð stigminnkandi skammta til að sýna fram á vensl svörunar og mismunandi skammtastærða, ef einhver eru, og að engin merkjanleg, skaðleg áhrif komi fram við minnstu skammtastærð (NOAEL). Að jafnaði skal velja skammta þannig að greina megi milli fyrsta stigs eiturhrifa á taugakerfið og áhrifa sem tengjast altækum eiturhrifum. Oft er ákjósanlegt að hafa bilin 2–3 og oft er betra að bæta fjórða prófunarhópnum við en að hafa mjög stór bil milli skammtastærða (t.d. stærri en sem nemur stuðlinum 10). Ef til er raunsætt mat á váhrifum á menn skal einnig taka tillit til þess.

1.5.5. **Markprófun**

Ef engin merkjanleg taugaeiturhrif koma fram í rannsókn með einni skammtastærð, sem er a.m.k. 1000 mg/kg líkamsþyngdar á dag, og notuð eru verkferlin sem lýst er fyrir þessa rannsókn, og ef eiturhrifa er ekki að vænta samkvæmt gögnum um efnasambönd sem eru skyld að byggingu kann fullnaðarrannsókn með þremur skammtastærðum að teljast ónauðsynleg. Þau váhrif, sem búist er við að menn verði fyrir, geta bent til þess að nota þurfi stærri skammta við gjöf um munn í markprófuninni. Þegar ákomuleið er önnur, t.d. innöndun eða um húð, ákvarðast sá váhrifastyrkur, sem hægt er að ná að hámarki, oft af eðlisefnafræðilegum eiginleikum prófunarefnisins. Við rannsókn á bráðum eiturhrifum (efni gefið um munn) skal markprófunarskammturinn vera a.m.k. 2000 mg/kg.

1.5.6. **Gjöf skammta**

Dýrin fá skammt af prófunarefninu daglega, sjö daga vikunnar í a.m.k. 28 daga; ef efnið er gefið 5 daga vikunnar eða váhrifatímabilið er styttra skal færa gild rök fyrir því. Ef prófunarefnið er gefið í maga skal það gert í einum skammti með magaslöngu eða annarri heppilegri inngjafarslöngu. Stærð tilraunadýrsins ræður því hve mikinn vökva má gefa inn í einu. Rúmmálið skal ekki vera meira en 1 ml/100 g líkamsþyngdar. Þegar um er að ræða vatnslausnir geta þó 2 ml/100 g líkamsþyngdar komið til greina. Ef ekki er um að ræða ertandi eða ætandi efni, sem venjulega hafa í för með sér þeim mun verri áhrif sem styrkleikinn er meiri, skal halda prófunarrúmmálinu sem jöfnustu með því að stilla styrkleikann þannig að rúmmálið haldist stöðugt við allar skammtastærðir.

Þegar um er að ræða efni sem eru gefin inn með fóðri eða drykkjarvatni er mikilvægt að tryggja að magn prófunarefnisins raski ekki venjulegu næringar- og vökvajafnvægi. Þegar prófunarefni er gefið inn með fóðri má nota annaðhvort nota fastan styrk (í milljónarhlutum) í fóðrinu eða fasta skammtastærð miðað við líkamsþyngd dýranna en taka skal fram hvor kosturinn er valinn. Ef efnið er gefið með magaslöngu skal gefa skammtinn á svipuðum tíma á hverjum degi og stilla hann eftir þörfum þannig að skammtastærðin sé alltaf sú sama miðað við líkamsþyngd dýrsins. Þegar rannsókn með endurteknum skömmtum er undanfari langtímarannsóknar skal fóðrið vera það sama í báðum rannsóknum. Ef um er að ræða rannsókn á bráðum eiturhrifum og ekki er hægt að gefa allan skammtinn í einu lagi má gefa hann inn í smærri hlutum á 24 klukkustundum hið mesta.

1.6. ATHUGANIR

1.6.1. **Tíðni athugana og prófana**

Í rannsóknum á endurteknum skammti skal athugunartímabilið ná yfir allt skammtatímabilið. Í rannsóknum á bráðum eiturhrifum skulu athuganir standa yfir í aðra 14 daga að lokinni meðferð. Dýr í fylgihópum, sem eru látin vera án váhrifa á tilteknu tímabili að lokinni meðferð, skulu einnig athuguð á þessu tímabili.

Athuganir skulu gerðar nægilega þétt til að hámarkslíkur séu á því að greina megi hvers konar atferlistengdan og/eða taugafræðilegan afbrigðileika. Helst á að gera athuganir á sömu tímum á hverjum degi og með hliðsjón af því hvenær vænta má hámarksáhrifa af skammtagjöfinni. Yfirlit yfir tíðni klínískra athugana og starfrænna prófana er í töflu 2. Ef hvarfafræðileg gögn eða önnur gögn, sem eru fengin úr fyrri rannsóknum, benda til þess að athuganir eða prófanir, eða athuganir að loknu skammtatímabili, þurfi að fara fram á öðrum tímum skal setja aðra tímaáætlun með það fyrir augum að ná fram sem mestum upplýsingum. Ef tímaáætlun er breytt skal það rökstutt.

1.6.1.1. *Athuganir á almennu heilbrigðisástandi og dauða/sjúkdómsástandi*

Öll dýr skulu skoðuð vandlega a.m.k. einu sinni á dag með tilliti til heilsufars og a.m.k. tvisvar á dag með tilliti til sjúkdómsástands og dauða.

1.6.1.2. *Ítarlegar, klínískar athuganir*

Gera skal ítarlegar klínískar athuganir á öllum dýrum sem hafa verið valin í þeim tilgangi (sjá töflu 1), einu sinni fyrir fyrstu skammtagjöf (svo að koma megi við samanburði hjá hverju einstöku dýri) og með mismunandi millibilum eftir það, háð lengd rannsóknarinnar (sjá töflu 2). Við lok batatímabilsins skal gera ítarlegar, klínískar athuganir á fylgihópum sem eru batahópar. Gera skal ítarlegar klínískar athuganir utan búrs dýranna í stöðluðu rými. Þær skulu vandlega skráðar og nota skal stigakerfi sem felur í sér viðmiðanir eða kvarða fyrir hverja mælingu við athuganirnar. Rannsóknarstofan skal skilgreina á skýran hátt viðmiðanirnar eða kvarðana sem eru notuð. Leitast skal við að tryggja að prófunarskilyrðin séu sem jöfnust (ekki tengd meðferðinni á kerfisbundinn hátt) og æskilegt er að þeir sem athuga dýrin þekki ekki til raunverulegu meðferðarinnar.

Mælt er með því að athuganirnar séu gerðar eftir föstu formi þar sem vel skilgreindum viðmiðunum (þ.m.t. skilgreining á því sem telst venjulegt „dreifisvið“) er kerfisbundið beitt á hvert dýr í hvert skipti sem athugun fer fram. „Venjulegt dreifisvið“ skal skjalfest skilmerkilega. Öll sýnileg merki skulu skráð. Einnig skal skrá umfang sýnilegra merkja ef ástæða þykir til þess. Klínískar athuganir skulu m.a., en ekki einvörðungu, ná yfir breytingar í húð, feldi, augum og slímhúð, tilvik af seytingu og úrgangslosun og ósjálfráðri starfsemi (t.d. táramyndun, hárrisi, stærð augasteins, óeðlilegu öndunarmynstri og/eða öndun um munn, óeðlilegum merkjum um þvaglát eða hægðir og litarbreytingum í þvagi).

Einnig skal gefa gaum að öllum óvenjulegum svörunum að því er varðar líkamsstöðu, virknistig, (t.d. minnkuð eða aukin könnun á staðlaða rýminu) og samhæfingu hreyfinga. Skrá skal breytingar á göngulagi (t.d. kjag, slingur), líkamsstöðu (t.d. kryppu) og viðbrögð við meðhöndlun, staðsetningu eða öðru umhverfisáreiti, svo og hreyfingar sem stafa af vöðvakippum eða vöðvaspennu, krampa eða skjálfta, staglkennt atferli (t.d. ef dýrin snyrta sig í sífellu, gera óvenjulegar höfuðhreyfingar eða ganga stöðugt í hringi) eða undarlega hegðun (t.d. ef dýrin bíta sig eða sleikja sig óhóflega, skaða sig sjálf, ganga afturábak, gefa frá sér hljóð) eða sýna árásarhneigð.

1.6.1.3. *Starfrænar prófanir*

Starfrænar prófanir skulu, líkt og ítarlegur, klínískar athuganir, einnig fara fram einu sinni áður en skammtar eru gefnir og oft eftir það á öllum dýrum sem hafa verið valin í þeim tilgangi (sjá töflu 1). Tíðni starfrænna prófana fer einnig eftir því hve lengi rannsóknin stendur yfir (sjá töflu 2). Auk athugun-artímabila, sem sett eru fram í töflu 2, skulu starfrænar athuganir á fylgihópum, sem eru batahópar, einnig gerðar svo nærri aflífun í lok rannsóknarinnar sem framast er kostur. Starfrænar prófanir skulu fela í sér mat á skynviðbrögðum við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- og sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri (5.–7. heimild)), mat á gripstyrk (8. heimild) og á mat hreyfivirkni (9. heimild). Hreyfivirkni skal mæld með sjálfvirkum búnaði sem getur numið bæði minnkun og aukningu í virkninni. Ef annað skilgreint kerfi er notað skal það vera megindlegt og sýna verður fram á næmi þess og áreiðanleika. Prófa skal sérhvert tæki til að tryggja áreiðanleika til langs tíma og samkvæmni á milli tækja. Nánari lýsingu á verkferlunum, sem fylgja má, er að finna í þeim heimildum sem vísað er til. Ef engin gögn eru til (þ.e. um vensl efnabyggingar og virkni, faraldsfræðileg gögn og gögn um aðrar rannsóknir í eiturefnafræði) sem benda til þess að um taugaeiturhrif sé að ræða er rétt að vega og meta hvort gera skuli sérhæfðari rannsóknir á starfsemi skynfæra og hreyfistarfsemi eða hæfileikanum til að læra og muna til að rannsaka nánar hvort um slík áhrif sé að ræða. Nánari upplýsingar um sérhæfðari prófanir og notkun þeirra er að finna í 1. heimild.

Í undantekningartilvikum má sleppa dýrum úr prófun ef þau bera merki um eiturhrif í þeim mæli að það myndi trufla starfrænu prófanirnar verulega. Færa skal rök fyrir því ef dýrum er sleppt úr prófun á starfrænum þáttum.

1.6.2. **Líkamsþyngd og fóðurát/vatnsdrykkja**

Í rannsóknum, sem standa allt að 90 daga, skulu öll dýr vigtuð a.m.k. einu sinni í viku og fóðurát þeirra mælt (og vatnsdrykkja ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) a.m.k vikulega. Í langtímarannsóknum skulu öll dýr vigtuð a.m.k. einu sinni í viku fyrstu 13 vikurnar og a.m.k. fjórðu hverja viku eftir það. Mæla

skal fóðurát (og vatnsdrykkju ef prófunarefnið er gefið með drykkjarvatni) a.m.k. vikulega fyrstu 13 vikurnar og síðan á u.þ.b. þriggja mánaða fresti nema breytingar á heilbrigðisástandi eða líkamsþyngd gefi tilefni til annars.

1.6.3. **Augnlæknisfræði**

Í rannsóknum, sem standa lengur en 28 daga, skal fara fram augnskoðun með augnspegli eða öðru jafngildu tæki sem hentar áður en prófunarefnið er gefið og í lok rannsóknarinnar og helst skal skoða öll dýrin en a.m.k. dýrin í hópnum sem fær stærsta skammtinn og í samanburðarhópunum. Ef breytingar greinast í augum dýra skulu öll dýrin skoðuð og ef klínísk einkenni benda til að þess að þörf sé á skoðun. Í langtímarannsóknum skal einnig fara fram augnskoðun eftir 13 vikur. Ekki þarf að framkvæma augnskoðun ef slík gögn eru þegar fyrir hendi úr öðrum rannsóknum sem eru svipaðar að lengd og skammtastærðir svipaðar.

1.6.4. **Blóðfræði og klínísk, lífefnafræði**

Ef rannsókn á taugaeiturhrifum fer fram ásamt rannsókn á altækum eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf skulu blóðrannsóknir og klínískar, lífefnafræðilegar mælingar gerðar samkvæmt tilsvarandi aðferð í rannsókninni á altækum eiturhrifum. Sýnataka skal fara fram á þann hátt að öll hugsanleg áhrif á taugafræðilegt atferli séu í lágmarki.

1.6.5. **Vefjameinafræði**

Taugameinafræðileg rannsókn skal gerð með það fyrir augum að vera til fyllingar og aukningar þeim athugunum sem eru gerðar í þeim hluta rannsóknarinnar sem gerð er í lífi. Vefir úr a.m.k. 5 dýrum af hvoru kyni og úr hverjum hópi (sjá töflu 1 og næstu málsgrein) skulu steyptir staðnum og notuð almennt viðurkennd tækni við gegnflæði og festingu (sjá 5. kafla 3. heimildar og 50. kafla 4. heimildar). Allar merkjanlegar, stórsæjar breytingar skulu skráðar. Ef rannsókn fer fram sem sjálfstæð rannsókn þar sem skimað er eftir taugaeiturhrifum eða til að lýsa taugaeiturfræðilegum áhrifum má nota þau dýr sem eftir eru til sérstakra rannsókna með taugaatferlislegum (10. og 11. heimild), taugameinafræðilegum (10.–13. heimild), taugaefnafræðilegum (10., 11., 14. og 15. heimild) eða raflífeðlisfræðilegum (10., 11., 16. og 17. heimild) verkferlum sem geta komið til viðbótar við verkferlin og rannsóknirnar sem er lýst hér eða til að fjölga dýrum sem eru rannsökuð í vefjameinafræðilegum rannsóknum. Þessi viðbótarverkferli eru mjög gagnleg þegar reynsluathuganir eða áhrifin, sem vænst er, benda til taugaeiturhrifa sem eru af sérstakri tegund eða með sérstakt marklíffæri (2. og 3. heimild). Einnig er hægt að nota það sem eftir er af dýrunum í venjubundið, meinafræðilegt mat eins og lýst er í aðferðinni fyrir rannsóknir á endurteknum skömmtum.

Öll vefjasýni, sem eru steypt í paraffín, skulu lituð með staðlaðri aðferð, t.d. með hematoxýlíni og eósíni, og rannsökuð í smásjá. Ef merki finnast um úttaugakvilla eða grunur leikur á um slíkt skal rannsaka vef úr úttaug, steyptan í plast. Klínísk merki geta einnig gefið til kynna að rannsaka þurfi fleiri staði eða beita sérstökum litunaraðferðum. Leiðbeiningar um viðbótarstaði, sem rannsaka þarf, er að finna í 3. og 4. heimild. Einnig getur verið gott að nota hentuga sérliti til að staðfesta tilteknar tegundir meinafræðilegra breytinga (18. heimild).

Gera skal vefjameinafræðilega rannsókn á dæmigerðum sneiðum úr miðtaugakerfinu og úttaugakerfinu (sjá 5. kafla 3. heimildar og 50. kafla 4. heimildar). Svæðin sem skulu að jafnaði rannsökuð eru: framheilinn, miðja stórheilans, þ.m.t. sneið í gegnum drekann, miðheilinn, litli heilinn, heilabrúin, mænukylfan, augað ásamt sjóntaug og sjónhimnu, mænan við háls- og lendahluta, mænuhnoðin, taugaþræðir úr afturrót og framrót mænu, nærlæg settaug, nærlæg sköflungstaug (við hnéð) og greinar sköflungstaugarinnar í vöðva kálfans. Sneiðar af mænu og úttaugum skulu teknar bæði með þver- og langskurði. Veita skal æðaskipan taugakerfisins sérstaka athygli. Einnig skal rannsaka sýni úr beinagrindarvöðva, einkum úr kálfavöðvanum. Frumubygging og þráðabygging og -mynstur á stöðum í mið- og úttaugakerfinu, sem vitað er að verða sérstaklega fyrir áhrifum eiturefna sem hafa áhrif á taugar, skulu skoðuð sérstaklega vel.

Leiðbeiningar varðandi taugameinafræðilegar breytingar, sem venjulega orsakast af váhrifum eiturefnis, er að finna í 3. og 4. heimild. Mælt er með þrepskiptri rannsókn á vefjasýnum þar sem sneiðar úr hópnum, sem fær stærsta skammt prófunarefnis, eru fyrst bornar saman við sneiðar úr samanburðarhópnum. Ef engar taugameinafræðilegar breytingar eru merkjanlegar í sýnum úr þessum hópum er ekki þörf á frekari greiningu. Ef taugameinafræðilegar breytingar koma í ljós í í hópnum sem fær stærsta skammt prófunarefnis skal merkja og rannsaka raðbundið sýni úr öllum vefjum, sem gætu hugsanlega hafa orðið fyrir áhrifum, í hópunum sem fá meðalstóran og lítinn skammt.

Ef merki sjást um taugameinafræðilegar breytingar í eigindlegu rannsókninni skal önnur rannsókn fara fram á öllum svæðum taugakerfisins þar sem þessara breytinga hefur orðið vart. Sneiðar úr öllum skammtahópum af hverju og einu svæði, sem hefur hugsanlega orðið fyrir áhrifum, skulu merktar með kóða og rannsakaðar af handahófi án vitneskju um kóðann. Skrá skal tíðni og alvarleika allra vefjaskemmda. Þegar öll svæði allra skammtahópa hafa verið metin má rjúfa kóðann og láta tölfræðilega greiningu fara fram til að meta tengsl skammtastærðar og svörunar. Fyrir hverja skemmd skal lýsa dæmum um misalvarlegar vefjaskemmdir.

Taugameinafræðilegar niðurstöður skulu metnar með tilliti til athugana og mælinga á atferli og einnig til annarra gagna úr fyrri rannsóknum og samskeiða rannsóknum á altækum eiturhrifum prófunarefnisins.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Skrá skal gögn um hvert einstakt dýr. Auk þess skal taka öll gögn saman í töflu þar sem fram kemur, fyrir hvern prófunar- eða samanburðarhóp, fjöldi dýra við upphaf prófunar, fjöldi dýra sem drápust í prófun eða voru aflífuð af mannúðarástæðum, tími dauðsfalla eða aflífana af mannúðarástæðum, fjöldi dýra sem sýna merki um eiturhrif, lýsing á þeim merkjum sem koma fram um eiturhrif, þ.m.t. hvenær þau koma fram, hve lengi þau vara og hve alvarleg eiturhrifin eru, í hve mörgum dýrum vefjaskemmdir koma fram, þ.m.t. tegund og alvarleiki vefjaskemmdar eða vefjaskemmda.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Niðurstöður þessarar rannsóknar skulu metnar á grundvelli fjölda tilvika, alvarleika og fylgni milli taugafræðilegs atferlis og taugameinafræðilegra áhrifa (sem og taugaefnafræðilegra eða raflífeðlisfræðilegra áhrifa ef viðbótarrannsóknir teljast með) og allra annarra skaðlegra áhrifa sem koma fram. Ef unnt er skal meta tölulegar niðurstöður með heppilegri og almennt viðurkenndri, tölfræðilegri aðferð. Velja skal tölfræðiaðferðir á hönnunarstigi rannsóknarinnar.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— eðlisástand og hverfi (e. *isomerism*), hreinleiki og eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— auðkennisgögn.

Burðarefni (ef við á):

— rök fyrir vali á burðarefni.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni, aðbúnaður, aðlögun, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs við upphaf prófunar.

Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um samsetningu prófunarefnisins eða blöndun þess í fóður, styrkinn sem náðist og stöðugleika og einsleitni blöndunnar,

— upplýsingar um gefna skammta, þ.m.t. upplýsingar um burðarefni, magn og eðlisástand efnisins sem er gefið,

— upplýsingar um það hvernig prófunarefnið er gefið,

— rök fyrir vali á skammtastærð,

— rök fyrir íkomuleið og lengd váhrifatíma

— umreikningur á styrk prófunarefnisins (í milljónarhlutum) í fóðri/drykkjarvatni yfir í raunskammtastærð (mg/kg líkamsþyngdar á dag), ef við á,

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

Athugun og prófunaraðferðir:

— upplýsingar um það hvernig dýr hafa verið valin úr hverjum hópi í undirhópa til gegnflæðis,

— upplýsingar um stigakerfi, þ.m.t. viðmiðanir og stigakvarðar fyrir hverja mælingu í hinum ítarlegu, klínísku athugunum,

— upplýsingar um starfrænar prófanir til að meta skynviðbrögð við áreiti af ýmsu tagi (t.d. hljóð- og sjónrænu áreiti og áreiti á stöðu- og hreyfiskynfæri) og einnig til að meta gripstyrk og hreyfivirkni (þ.m.t. upplýsingar um sjálfvirkan búnað sem er notaður til að nema virki) og upplýsingar um önnur verkferli sem eru notuð,

— upplýsingar um augnskoðanir og, ef við á, blóðrannsóknir og klínískar, lífefnafræðilegar prófanir með viðeigandi viðmiðunargildum,

— upplýsingar um sérstök verkferli sem varða taugafræðilegt atferli, taugameinafræði, taugaefnafræði eða raflífeðlisfræði.

Niðurstöður:

— líkamsþyngd/breytingar á líkamsþyngd, þ.m.t. líkamsþyngd við aflífun,

— fóðurát og vatnsdrykkja, eftir því sem við á,

— gögn um eiturefnasvörun eftir kyni og skammtastærð, þ.m.t. merki um eiturhrif eða dauði,

— eðli, alvarleiki og varanleiki (hvenær þeirra verður vart og hvernig þau þróast) þeirra atriða sem koma fram við ítarlega, klíníska athugun (hvort þau geta gengið til baka eða ekki),

— ítarleg lýsing á niðurstöðum allra starfrænna prófana,

— niðurstöður krufningar,

— ítarleg lýsing á öllum taugaatferlislegum, taugameinafræðilegum og taugaefnafræðilegum eða raflífeðlisfræðilegum niðurstöðum, liggi þær fyrir,

— gögn um frásog og efnaskipti, liggi þau fyrir,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á.

Umfjöllun um niðurstöður.

— upplýsingar um tengsl milli skammts og svörunar,

— tengsl annarra eiturhrifa, ef einhver eru, við niðurstöður um taugaeiturhrifamátt prófunarefnisins,

— mörk um engin merkjanleg, skaðleg áhrif.

Niðurstöður.

— hvatt er til sérstakrar yfirlýsingar um taugaeiturhrif prófunarefnisins í heild.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3) World Health Organisation (WHO) (1986) Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980) Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B., (1980) Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, bls. 999-1003.

6) Gad, S.C., (1982) A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, bls. 691-704.

7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M., (1991) Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, bls. 267-283.

8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T., (1979) A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, bls. 233-236.

9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, bls. 599-609.

10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds., (1992) Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11) Chang, L.W., ed., (1995) Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12) Broxup, B., (1991) Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, bls. 689-695.

13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C., (1992) Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, bls. 343-352.

14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, bls. 445-452.

15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B., (1988) Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, bls. 368-378.

16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G., (1982) Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, bls. 299-335.

17) Johnson, B.L., (1980) Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore/London, bls. 726-742.

18) Bancroft, J.D. and Steven A., (1990) Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tafla 1

Lágmarksfjöldi dýra sem þarf að vera í hverjum hópi þegar rannsókn á taugaeiturhrifum fer fram sem sjálfstæð rannsókn eða í tengslum við aðrar rannsóknir

	ÝMSAR ÚTFÆRSLUR RANNSÓKNAR Á TAUGAEITURHRIFUM			
	Sjálfstæð rannsókn	Rannsóknin er sameinuð 28 daga rannsókninni	Rannsóknin er sameinuð 90 daga rannsókninni	Rannsóknin er sameinuð rannsókninni á langvinnum eiturhrifum
Heildarfjöldi dýra í hverjum hópi	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	15 karldýr og 15 kvendýr	25 karldýr og 25 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn til starfrænna prófana, þ.m.t. til ítarlegra, klínískra athugana	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr	10 karldýr og 10 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn fyrir gegnflæði á staðnum og vegna taugavefjameinafræðilegra rannsókna	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr	5 karldýr og 5 kvendýr
Fjöldi dýra sem er valinn fyrir athuganir á eiturhrifum við endurtekna skammtagjöf, hálflangvinnum eiturhrifum eða langvinnum eiturhrifum, fyrir blóðrannsóknir, klínískar, lífefnafræðilegar rannsóknir, vefjameinafræðilegar rannsóknir o.s.frv., eins og tilgreint er í viðeigandi viðmiðunarreglum		5 karldýr og 5 kvendýr	10 karldýr (10) og 10 kvendýr ([10])	20 karldýr ([10]) og 20 kvendýr ([10])
Viðbótarathuganir eftir því sem við á	5 karldýr og 5 kvendýr			

([10]) Þ.m.t. eru fimm dýr sem valin eru fyrir starfrænar prófanir og ítarlegar, klínískar athuganir sem eru hluti af rannsókninni á taugaeiturhrifum

Tafla 2

Tíðni klínískra athugana og starfrænna prófana

Tegund athugunar		Lengd rannsóknartíma			
		Athugun á bráðum eiturhrifum	28 daga athugun	90 daga athugun	Athugun á langvinnum eiturhrifum
Á öllum dýrum	Almennt heilbrigðisástand	daglega	daglega	daglega	daglega
	Sjúkdómsástand/ dauði	tvisvar á dag	tvisvar á dag	tvisvar á dag	tvisvar á dag
Á dýrum sem eru valin til athugana á starfrænum þáttum	Ítarlegar, klínískar athuganir	— fyrir fyrsta váhrifatíma — innan 8 klst. frá skammtagjöf á áætluðum tíma hámarksáhrifa — á 7. og 14. degi eftir skammtagjöf	— fyrir fyrsta váhrifatíma — einu sinni í viku eftir það	— fyrir fyrsta váhrifatíma — einu sinni í fyrstu eða annarri váhrifaviku — mánaðarlega eftir það	— fyrir fyrsta váhrifatíma — einu sinni í lok fyrsta váhrifa-mánaðar — á þriggja mánaða fresti eftir það
	Starfrænar prófanir	— fyrir fyrsta váhrifatíma — innan 8 klst. frá skammtagjöf — á áætluðum tíma hámarks-áhrifa — á 7. og 14. degi eftir skammtagjöf	— fyrir fyrsta váhrifatíma — í fjórðu viku meðferðar eins nálægt lokum skammtatímabils og kostur er	— fyrir fyrsta váhrifatíma — einu sinni í fyrstu eða annarri váhrifaviku — mánaðarlega eftir það	— fyrir fyrsta váhrifatíma — einu sinni í lok fyrsta váhrifa-mánaðar — á þriggja mánaða fresti eftir það

B.44. UPPTAKA UM HÚÐ: AÐFERÐ MEÐ PRÓFUN Í LÍFI

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 427 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Þótt váhrifaleið margra íðefna sé aðallega um húð er notuð íkomuleið um munn í meirihluta eiturefnafræðilegra rannsókna sem gerðar eru á tilraunadýrum. Með rannsókninni í lífi á upptöku um húð, sem lýst er í þessari viðmiðunarreglu, fæst sú tenging sem er nauðsynleg til að unnt sé að yfirfæra frá rannsóknum með gjöf um munn við vinnslu öryggismats eftir váhrif í gegnum húð.

Efni þarf að fara í gegnum mörg frumulög húðarinnar áður en það kemst í blóðrásina. Hornlag húðarinnar, sem samanstendur af dauðum frumum, er hraðaákvarðandi lagið fyrir flest efni, Gegndræpi gegnum húðina er háð bæði fitusækni íðefnisins og þykkt ytra lags húðþekjunnar sem og þáttum á borð við mólþyngd og styrk efnisins. Almennt er húð rotta og kanína gegndræpari en mannshúð en gegndræpi naggrísa- og apahúðar líkari gegndræpi mannshúðar.

Aðferðunum fyrir mælingu á upptöku um húð má skipta í tvo flokka, mælingu í lífi og mælingu í glasi.Aðferðin með prófun í lífi getur veitt góðar upplýsingar um upptöku um húð hjá ýmsum tegundum tilraunadýra. Nýlega hafa verið þróaðar aðferðir til prófunar í glasi. Þar er notaður flutningur í gegnum dýra- eða mannshúð af fullri þykkt eða þynnta, yfir í vökvageymi. Aðferðinni með prófun í glasi er lýst í sérstakri prófunaraðferð (1. heimild). Mælt er með því að leiðbeiningarskjal Efnahags- og framfarastofnunarinnar fyrir framkvæmd rannsókna á upptöku um húð (2. heimild) sé haft til hliðsjónar við val á heppilegustu aðferðinni við gefnar aðstæður þar eð skjalið inniheldur ítarlegar upplýsingar um hvaða aðferðir til prófunar í lífi eða í glasi hæfi best.

Aðferðin með prófun í lífi, sem lýst er í þessari aðferð, gerir kleift að ákvarða gegnþrengingu prófunarefnis í gegnum húðina og inn í almennu blóðrásina. Þessi aðferð hefur verið notuð víða í mörg ár (3.–7. heimild). Þó að rannsóknir í glasi á upptöku um húð eigi við í mörgum tilvikum geta aðstæður verið með þeim hætti að einungis sé unnt að afla nauðsynlegra gagna með rannsókn í lífi.

Kostir aðferðarinnar með prófun í lífi eru að þar er notað lífeðlisfræðilegt kerfi og efnaskiptakerfi, dýrategundin er sú sama og í mörgum eiturhrifarannsóknum og hægt er að aðlaga aðferðina til notkunar á aðrar dýrategundir. Ókostirnir eru notkun lifandi dýra, þörfin fyrir geislamerkt efni til að auka líkur á áreiðanlegum niðurstöðum, erfiðleikar við að ákvarða snemmstig upptöku og loks munurinn á gegndræpi húðar kjörtegundarinnar (sem eru rottur) og mannshúðar. Dýrahúð er venjulega gegndræpari en hjá mönnum sem getur leitt til ofmats á upptöku um húð hjá mönnum (6., 8. og 9. heimild). Ekki skal prófa tærandi og ætandi efni á lifandi dýrum.

1.2. SKILGREININGAR

Óupptekinn skammtur: sá hluti skammtsins, sem er þveginn af yfirborði húðarinnar að váhrifum loknum og sá hluti sem er á ólofthéttu umbúðunum, þ.m.t. sá hluti sem sýnt er fram á að gufar upp af húðinni meðan á váhrifum stendur.

Upptekinn skammtur (í lífi): sá hluti skammtsins sem kemur fram í þvagi, búrþvottavatni, saur, útöndunarlofti (ef það er mælt), blóði og vefjum (ef þeim er safnað) og í því sem eftir er af skrokknum eftir að húðin á áburðarsvæðinu hefur verið fjarlægð.

Upptakanlegur skammtur: sá hluti skammtsins sem er á eða í húðinni að þvotti loknum.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið, helst geislamerkt, er borið á rakaða húð dýranna í einni eða fleiri viðeigandi skammtastærðum í formi efnablöndu sem er lýsandi fyrir efnablönduna sem er í almennri notkun. Prófunarblandan er látin vera í snertingu við húðina í ákveðinn tíma undir hentugum umbúðum (ólofthéttum, hálflofthéttum eða lofthéttum) til að hindra að dýrin innbyrði prófunarblönduna. Við lok váhrifatímans eru umbúðirnar fjarlægðar og húðin hreinsuð með viðeigandi hreinsiefni, umbúðirnar og hreinsiefnið eru geymd til greiningar og nýjar umbúðir settar á húðina. Dýrin eru hýst hvert í sínu efnaskiptabúri fyrir, á og eftir váhrifatímabilið og úrgangsefnum og útöndunarlofti er safnað til greiningar.

Sleppa má því að safna útöndunarlofti ef fyrir hendi eru fullnægjandi upplýsingar um að lítið eða ekkert myndist af rokgjörnum, geislavirkum umbrotsefnum. Hver rannsókn felur venjulega í sér notkun nokkurra hópa dýra sem eru látin verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu. Einn hópur er aflífaður í lok váhrifatímabilsins. Aðrir hópar eru aflífaðir eftir það á fyrirframákveðnum tímapunktum (2. heimild). Í lok sýnatökutímans eru dýrin sem eftir eru aflífuð, blóði safnað til greiningar, húðin á áburðarsvæðinu fjarlægð til greiningar og skoðað hvort skrokkurinn innihaldi eitthvað af efni sem ekki hefur skilist út. Sýnin eru greind með viðeigandi aðferðum og stærð upptöku um húð metin (6., 8. og 9. heimild).

1.4. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.4.1. **Val á dýrategund**

Rottur eru sú tegund sem oftast er notuð en einnig má nota hárlausa stofna og tegundir þar sem upptaka um húð er líkari upptöku um húð hjá mönnum (3., 6., 7., 8. og 9. heimild). Nota skal ung, fullvaxin, heilbrigð dýr af sama kyni (venjan er að nota karlkyn) og af algengum rannsóknarstofustofnum. Við upphaf rannsóknarinnar ætti breytileiki í þyngd dýranna, sem eru notuð, ekki að víkja meira en ± 20% frá meðalþyngdinni. Sem dæmi að nefna henta 200–250 g karlrottur vel, sérstaklega þær sem falla í efri helming þessa sviðs.

1.4.2. **Fjöldi og kyn dýra**

Nota skal hóp með minnst fjórum dýrum af sama kyni fyrir hverja prófunarblöndu og hvern lokatímapunkt samkvæmt áætlun (e. *scheduled termination time*). Hver hópur dýra er aflífaður eftir mismunandi tíma, t.d. í lok váhrifatímabilsins (venjulega 6 eða 24 klst.) eða á síðari tímapunktum (t.d. eftir 48 og 72 klst.). Ef fáanleg eru gögn sem sýna verulegan mun milli karl- og kvendýra á eiturhrifum á húð skal velja næmara kynið. Ef slík gögn eru ekki fyrir hendi má nota hvort kynið sem er.

1.4.3. **Aðbúnaður og fóðrun**

Hiti í vistarverum tilraunadýranna skal vera 22 °C (± 3 ºC). Þótt rakastig eigi að vera minnst 30% og helst ekki yfir 70%, nema við þrif á vistarverunum, er kjörraki 50–60%. Nota skal gervilýsingu og hafa til skiptis birtu í 12 klukkustundir og myrkur í 12 klukkustundir. Nota má hefðbundið rannsóknarstofufóður, og skal vera að því frjáls aðgangur, ásamt ótakmörkuðu drykkjarvatni. Meðan á rannsókninni stendur og helst einnig meðan á aðlögun stendur eru dýrin hýst hvert í sínu efnaskiptabúri. Þar eð fóður og vatnsleki geta haft áhrif á niðurstöðurnar skal draga sem mest úr líkum á slíkum atburðum.

1.4.4. **Dýrin undirbúin**

Dýrin eru merkt svo að þau þekkist í sundur og höfð í búrum sínum í a.m.k. fimm daga áður en rannsóknin hefst til að þau venjist umhverfisaðstæðum á rannsóknarstofunni.

Eftir aðlögunartímabilið og u.þ.b. 24 klukkustundum fyrir skömmtun er húðin rökuð á svæði á bógum og baki. Gegndræpiseiginleikar skaddaðrar húðar eru aðrir en heillar húðar svo að varast skal að skaða húðina. Eftir rakstur og u.þ.b. 24 klukkustundum áður en prófunarefnið er borið á húðina (sjá lið 1.4.7) skal þurrka húðyfirborðið með asetoni til að fjarlægja húðfeiti. Ekki er mælt með þvotti með sápu og vatni til viðbótar vegna þess að sápuleifar gætu aukið upptöku prófunarefnisins. Svæðið verður að vera nægilega stórt til að hægt sé að gera áreiðanlega útreikninga á uppteknu magni prófunarefnisins á hvern cm^2 húðar, helst a.m.k. 10 cm^2. Svæði af þessari stærð næst á rottum sem eru 200–250 g að líkamsþyngd. Eftir undirbúning eru dýrin sett aftur í efnaskiptabúrin.

1.4.5. **Prófunarefni**

Rannsaka á gegnþrengingareiginleika prófunarefnisins. Best er að prófunarefnið sé geislamerkt.

1.4.6. **Undirbúningur prófunar**

Prófunarefnablandan (t.d. óblandað, þynnt eða samsett efni sem inniheldur prófunaríðefnið sem er borið á húðina) skal vera sú sama (eða raunhæft staðgönguefni) og sú sem menn eða aðrar hugsanlegar marktegundir gætu orðið fyrir váhrifum af. Ef munur er á prófunarefnablöndunni og efnablöndunni sem er í almennri notkun skal það rökstutt. Ef nauðsyn krefur er prófunarefnið leyst upp eða útbúin úr því svifblanda í heppilegu burðarefni. Ef notuð eru önnur burðarefni en vatn skulu upptökueiginleikar þess og hugsanlegar milliverkanir við prófunarefnið vera þekkt.

1.4.7. **Borið á húðina**

Á yfirborði húðarinnar er áburðarsvæði af tiltekinni stærð skilgreint. Prófunarblandan er síðan borin jafnt á staðinn í þekktu magni. Venjulega er notað magn sem svarar til þess sem menn gætu orðið fyrir váhrifum af, að jafnaði 1–5 mg/cm^2 fyrir föst efni eða allt að 10 µl/cm^2 fyrir vökva. Ef magnið er annað skal rökstyðja það með líklegum notkunarskilyrðum, markmiðum rannsóknarinnar eða eðliseiginleikum prófunarblöndunnar. Eftir áburð þarf að verja meðferðarsvæðið fyrir snyrtiathöfnum. Dæmi um dæmigerðan búnað er sýnt á mynd 1. Venjulega er svæðið, sem borið er á, hulið með óloftþéttum umbúðum (t.d. gegndræpri nælongrisju). Ef borið er á í ótakmörkuðu magni (e. *infinite application*) skal svæðið, sem borið er á, hulið með loftþéttum umbúðum. Þegar uppgufun hálfrokgjarnra prófunarefna dregur svo mikið úr endurheimtarhlutfalli prófunarefnisins að ekki má við una (sjá einnig fyrstu málsgrein liðar 1.4.10) er nauðsynlegt að fanga uppgufaða efninu í viðarkolasíu sem hylur áburðarbúnaðinn (sjá mynd 1). Mikilvægt er að enginn búnaður skaddi húðina né sogi í sig prófunarblönduna eða hvarfist við hana. Dýrin eru sett aftur hvert í sitt efnaskiptabúr til að unnt sé að safna úrgangsefnum.

1.4.8. **Váhrifatími og sýnataka**

Váhrifatíminn er tíminn frá því prófunarblandan er borin á og þar til hún er fjarlægð með því að þvo húðina. Nota skal viðeigandi váhrifatímabil (venjulega 6 eða 24 klst.) sem miðast við þann váhrifatíma sem búist er við hjá mönnum. Eftir váhrifatímabilið eru dýrin höfð í efnaskiptabúrunum fram að lokum rannsóknarinnar samkvæmt áætlun (e. *scheduled termination*). Athuga skal dýrin með reglulegu millibili allan rannsóknartímann með tilliti til merkja um eiturhrif og með tilliti til afbrigðilegra viðbragða. Í lok váhrifatímabilsins skal athuga hvort merki um ertingu sjáist á meðhöndluðu húðinni.

Efnaskiptabúrin skulu vera þannig gerð að hægt sé að safna þvagi og saur, hvoru fyrir sig, í gegnum alla rannsóknina. Einnig þarf að vera unnt að safna ^{14}C-koltvísýringi og rokgjörnum ^{14}C-kolefnissamböndum sem skal greina ef þau myndast í miklu magni (> 5%). Þvagi, saur og síuvökvum (t.d. ^{14}C-koltvísýringi og rokgjörnum ^{14}C-efnasamböndum) skal safna, hverju fyrir sig, frá hverjum hópi á hverjum sýnatökutíma. Ef fullnægjandi upplýsingar liggja fyrir um að lítið eða ekkert myndist af rokgjörnum, geislavirkum umbrotsefnum má nota opin búr.

Úrgangsefnum er safnað meðan á váhrifatímabilinu stendur, í allt að 24 klst. eftir fyrstu snertingu við húð og síðan daglega fram að lokum tilraunarinnar. Þó að þrjú úrgangssöfnunartímabil nægi að jafnaði getur fyrirhugaður tilgangur með prófunarblöndunni eða fyrirliggjandi hvarfafræðileg gögn bent til þess að nota þurfi heppilegri tímapunkta eða fleiri tímapunkta fyrir viðkomandi rannsókn.

Í lok váhrifatímabilsins er hlífðarbúnaðurinn fjarlægður af hverju dýri og geymdur sér til greiningar. Þvo skal meðhöndlaða húðsvæðið á öllum dýrunum minnst þrisvar sinnum með hreinsiefni og hentugum þvottahnoðra. Gæta þarf þess að menga ekki aðra skrokkhluta. Hreinsiefnið skal vera dæmigert fyrir venjulegar hreinlætisaðgerðir, t.d. lausn af vatni og sápu. Að lokum skal þurrka húðina. Geyma þarf alla þvottahnoðra og allt skolvatn fyrir greiningu. Dýr í hópum sem eru rannsakaðir á seinni tímapunktum skulu fá nýjar umbúðir til að verja meðferðarsvæðið áður en þau eru sett aftur hvert í sitt búr.

1.4.9. **Lokaverkferli**

Dýrin í hverjum hópi skulu aflífuð á áætluðum tíma og blóði þeirra safnað til greiningar. Fjarlægja skal hlífðarbúnaðinn eða umbúðirnar til greiningar. Húðsvæðið, sem borið var á, og álíka svæði af ómeðhöndlaðri, rakaðri húð skulu fjarlægð af hverju dýri og greind hvort um sig. Kljúfa má áburðarsvæðið í sundur til að aðskilja hornlagið frá undirliggjandi húðþekju í því skyni að afla frekari upplýsinga um dreifingu prófunarefnisins. Ákvörðun á þessari dreifingu í tiltekinn tíma eftir váhrifatímabilið ætti að gefa einhverjar vísbendingar um afdrif prófunarefnis í hornlagi húðarinnar. Til að auðvelda uppskiptingu húðarinnar (eftir lokaþvott hennar og aflífun dýrsins) eru allar hlífðarumbúðir fjarlægðar. Húðsvæðið sem borið var á, ásamt hringlaga húðsvæði í kring, er skorið af rottunni og fest á plötu. Límbandsbútur er settur á húðyfirborðið og þrýst mjúklega niður og límbandið síðan fjarlægt ásamt hluta af hornlagi húðarinnar. Haldið er áfram að setja límbandsbúta á húðina uns límbandið loðir ekki lengur við húðyfirborðið þegar allt hornlag húðarinnar hefur verið fjarlægt. Setja má alla límbandsbútana frá hverju dýri saman í eitt ílát sem vefjameltiefni er bætt í til að leysa upp hornhúðina. Fjarlægja má alla hugsanlega markvefi til mælinga á hverjum um sig áður en greining fer fram á uppteknum skammti í því sem eftir er af skrokknum. Geyma skal skrokkinn af hverju dýri til greiningar. Venjulega nægir greining á heildar-innihaldinu í skrokknum. Fjarlægja má marklíffæri til greiningar á hverju þeirra um sig (ef ábendingar eru fyrir því frá öðrum rannsóknum). Þvagi, sem er í þvagblöðru við aflífun á áætluðum tíma, skal bæta við það þvag sem áður hefur verið safnað. Að lokinni söfnun á úrgangsefnum úr efnaskiptabúrunum á áætluðum aflífunartíma skal þvo búrin og síur þeirra með viðeigandi leysi. Einnig skal greina annan búnað sem kann að vera mengaður.

1.4.10. **Greining**

Í öllum rannsóknunum þarf að nást fullnægjandi endurheimt (þ.e. meðaltal upp á 100 ± 10% af geislavirkninni). Rökstyðja þarf endurheimt sem fellur utan þessa dreifisviðs. Mæla skal magnið af skammtinum, sem var gefinn, í hverju sýni með viðeigandi fullgiltum aðferðum.

Í tölfræðilegum forsendum skal vera mælikvarði á dreifni samhliða prófana fyrir hvern skammt sem borinn er á.

2. **GÖGN**

Mæla skal eftirfarandi fyrir hvert dýr á hverjum sýnatökutíma fyrir prófunarefnið og/eða umbrotsefnin. Auk þess að greina frá einstaklingsgögnum skal greina frá gögnum, sem eru flokkuð saman eftir sýnatökutímum, sem meðalgildum:

— magn sem tengist hlífðarbúnaði,

— magn sem hægt er að ná af húðinni,

— magn í/á húðinni sem ekki er hægt að þvo af henni,

— magn í blóðsýnum,

— magn í úrgangi og útöndunarlofti (ef við á),

— magn sem eftir er í skrokknum og í líffærum sem e.t.v. eru fjarlægð til sérstakrar rannsóknar.

Hægt að ákvarða heildarmagnið, sem tekið er upp á hverjum tímapunkti, eftir magni prófunarefnis og/eða umbrotsefna í úrgangi, útöndunarlofti, blóði og í skrokknum. Einnig er hægt að reikna út magn prófunarefnis sem tekið er upp á hvern cm^2 húðar sem hefur komist í snertingu við prófunarefnið á váhrifatímabilinu.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Prófunarskýrslan skal ná yfir kröfurnar, sem mælt er fyrir um í aðferðarlýsingunni, ásamt rökstuðningi fyrir prófunarkerfinu sem er notað, og eftirtaldar upplýsingar skulu vera í skýrslunni:

prófunarefni:

— auðkennisgögn (t.d. CAS-númer, ef það er tiltækt, uppruni, hreinleiki (geislaefnafræðilegur hreinleiki), þekkt óhreinindi, lotunúmer),

— eðlisástand og eðlisefnafræðilegir eiginleikar (t.d. sýrustig, rokgirni, leysni, stöðugleiki, mólþyngd og log P_{ow}).

Prófunarefnablanda:

— samsetning og rökstuðningur fyrir notkun,

— upplýsingar um prófunarefnablönduna, magnið sem borið er á, styrkinn sem næst, burðarefni, stöðugleika og einsleitni.

Tilraunadýr:

— tegund/stofn sem eru notuð,

— fjöldi, aldur og kyn dýranna,

— uppruni dýranna, aðbúnaður, fóður o.s.frv.,

— þyngd hvers dýrs í upphafi prófunar.

Prófunarskilyrði:

— upplýsingar um gjöf prófunarblöndunnar (svæði sem borið er á, aðferðir við magngreiningu, loftþéttar umbúðir/óloftþéttar umbúðir, rúmmál, útdráttur, greining (e. *detection*)),

— upplýsingar um gæði fóðurs og vatns.

Niðurstöður:

— öll merki um eiturhrif,

— upplýsingar um upptöku settar upp í töflu (sýnd sem hraði, magn eða hundraðshluti),

— upplýsingar um heildarendurheimt í tilrauninni,

— túlkun á niðurstöðunum, samanburður við tiltæk gögn um upptöku prófunarefnasambandsins um húð.

Umfjöllun um niðurstöðurnar.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Prófunaraðferð B.45. Upptaka um húð: Aðferð með prófun í glasi.

2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) ECETOC, (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No 20.

4) Zendzian R.P. (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. J. Am. Coll. Toxicol. 8(5), bls. 829-835.

5) Kemppainen, B.W., Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6) EPA, (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

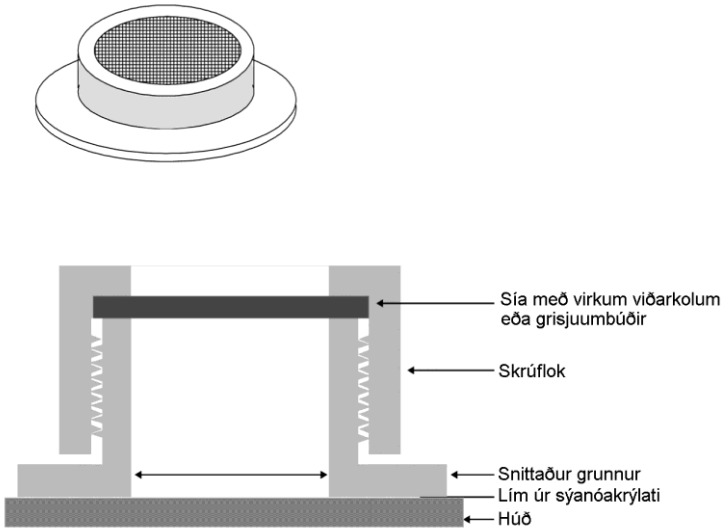
7) EPA, (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

8) Bronaugh, R.L., Wester, R.C., Bucks, D., Maibach H.I. and Sarason, R., (1990) In vivo percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. Fd. Chem. Toxic. 28, bls. 369-373.

9) Feldman, R.J. and Maibach, H.I., (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. J. Invest Dermatol. 54, bls. 399-404.

Mynd 1

Dæmi um hönnun á dæmigerðum búnaði sem er notaður til að afmarka og verja húðsvæði sem borið er á við rannsóknir í lífi á upptöku um húð



B.45. UPPTAKA UM HÚÐ: AÐFERÐ MEÐ PRÓFUN Í GLASI

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 428 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Þessi aðferð er hönnuð til að afla upplýsinga um upptöku prófunarefnis sem borið er á afskorna húð. Aðferðina má hvort heldur sem er sameina aðferðinni með upptöku um húð: aðferð með prófun í lífi (1. heimild) eða framkvæma hana sér. Mælt er með því að leiðbeiningaskjal OECD um framkvæmd rannsókna á upptöku um húð (2. heimild) sé haft til hliðsjónar við hönnun rannsókna sem byggjast á þessari aðferð. Leiðbeiningaskjalið var útbúið til að auðvelda val á viðeigandi verkferlum í glasi til notkunar við sérstakar kringumstæður og tryggja þar með áreiðanleika niðurstaðna sem fást með þessari aðferð.

Aðferðunum við mælingu á upptöku um húð og flutningi um húð má skipta í tvo flokka: mælingar í lífi og mælingar í glasi. Löng hefð er fyrir aðferðum með prófun í lífi á upptöku um húð og þær veita lyfjahvarfafræðilegar upplýsingar um fjölda dýrategunda. Aðferð með prófun í lífi er lýst sér í annarri prófunaraðferð (1. heimild). Aðferðir með prófun í glasi hafa einnig verið notaðar í mörg ár til að mæla upptöku um húð. Þótt ekki hafi verið gerðar formlegar fullgildingarrannsóknir á aðferðunum með prófun í glasi sem falla undir þessa prófunaraðferð samþykktu sérfræðingar OECD árið 1999 að næg gögn hefðu verið metin til að renna stoðum undir aðferðina með prófun í glasi (3. heimild). Í leiðbeiningaskjalinu er að finna frekari upplýsingar sem renna stoðum undir aðferðina, m.a. umtalsverður fjöldi beinna samanburðar-athugana á aðferðum með prófun í glasi og með prófun í lífi (2. heimild). Til er fjöldi greinargerða þar sem fjallað er um þetta viðfangsefni og gefnar nákvæmar bakgrunnsupplýsingar um notkun aðferða með prófun í glasi (4.–12. heimild). Með aðferðum með prófun í glasi er mælt flæði íðefna inn í og í gegnum húð yfir í vökvageymi og hægt er að nota dauða húð til að mæla flæði eingöngu eða ferska húð með virkum efnaskiptum til að mæla samtímis flæði og efnaskipti í húð. Þessar aðferðir hafa sérstaklega verið notaðar til að bera saman flutning íðefna í mismunandi samsetningum inn í og í gegnum húð og geta einnig gefið gagnlegar fyrirmyndir fyrir mat á upptöku um húð hjá mönnum.

Aðferðin með prófun í glasi hentar hugsanlega ekki fyrir allar aðstæður og flokka íðefna. Hugsanlega er hægt að nota aðferðina til prófunar í glasi til eigindlegs upphafsmats á gegnþrengingu um húð. Í ákveðnum tilvikum getur verið nauðsynlegt að fylgja því eftir með gögnum í lífi. Um frekari útlistun aðstæðna þar sem aðferðin með prófun í glasi myndi henta vísast til leiðbeiningarskjalsins (2. heimild). Ítarlegar viðbótarupplýsingar til stuðnings ákvörðuninni eru gefnar í 3. heimild.

Með þessari aðferð eru settar fram almennar meginreglur um mælingar á upptöku prófunarefnis sem og flutningi þess um húð þegar notuð er afskorin húð. Hægt er að nota húð af ýmsum spendýrategundum, þ.m.t. af mönnum. Gegndræpiseiginleikar húðar halda sér eftir að hún er skorin af líkamanum vegna þess að dauða hornlagið er helsti flæðitálminn, virkur flutningur íðefna í gegnum húðina hefur ekki verið sanngreindur. Sýnt hefur verið fram á að húðin geti breytt sumum íðefnum með efnaskiptum meðan á upptöku um húð stendur (6. heimild) en þetta ferli er ekki hraðatakmarkandi með tilliti til eiginlegs, upptekins skammts þó það geti haft áhrif á eðli efnisins sem fer inn í blóðrásina.

1.2. SKILGREININGAR

Óupptekinn skammtur: sá hluti skammtsins sem er þveginn af yfirborði húðarinnar að váhrifum loknum og sá hluti sem er á ólofthéttu umbúðunum, þ.m.t. sá hluti sem sýnt er fram á að gufar upp af húðinni meðan á váhrifum stendur.

Upptekinn skammtur (í glasi): massi prófunarefnis sem nær yfir í viðtökuvökvann eða í blóðrásina innan tiltekins tíma.

Upptakanlegur skammtur (í glasi): sá hluti skammtsins sem er á eða í húðinni að þvotti loknum.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunarefnið, sem getur verið geislamerkt, er borið á yfirborð húðsýnis sem aðskilur tvö hólf flæðikers. Íðefnið er haft á húðinni í tiltekinn tíma við tiltekin skilyrði uns það er fjarlægt með viðeigandi hreinsunaraðferð. Tekin eru sýni af viðtökuvökvanum á tilteknum tímapunktum meðan á tilrauninni stendur og þau greind m.t.t. prófunaríðefnisins og/eða umbrotsefna þess.

Ef notuð eru kerfi með virkum efnaskiptum má greina umbrotsefni prófunaríðefnisins með viðeigandi aðferðum. Í lok tilraunarinnar er dreifing prófunarefnisins og umbrotsefna þess magngreind þegar það á við.

Við viðeigandi skilyrði, sem er lýst í þessari aðferð og í leiðbeiningarskjalinu (2. heimild), er upptaka prófunarefnisins í tiltekinn tíma mæld með því að greina viðtökuvökvann og meðhöndluðu húðina. Líta skal svo á að prófunarefnið, sem eftir er í húðinni, hafi verið tekið upp nema hægt sé að sýna fram á að unnt sé að ákvarða upptöku út frá gildum í viðtökuvökvanum einum. Greining á öðrum efnisþáttum (efni sem þvegið er af húðinni og því sem eftir er inni í húðlögunum) gefur færi á frekara gagnamati, þ.m.t. á heildardreifingu prófunarefnisins og hundraðshluta endurheimtar.

Til að færa sönnur á frammistöðu og áreiðanleika prófunarkerfisins á rannsóknarstofunni sem framkvæmir prófunina skulu niðurstöður fyrir viðkomandi viðmiðunaríðefni vera tiltækar og í samræmi við birt skrif um aðferðina sem notuð er. Þessari kröfu má mæta með því að prófa viðeigandi viðmiðunarefni (helst efni með fitusækni sem er nálægt fitusækni prófunarefnisins) samskeiða prófunarefninu eða með því að leggja fram fullnægjandi rannsóknarsöguleg gögn fyrir mörg viðmiðunarefni með mismunandi fitusækni (t.d. koffín, bensósýru og testósterón).

1.4. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.4.1. **Flæðiker**

Flæðiker samanstendur af gjafahólfi og viðtökuhólfi og er húðin staðsett á milli þeirra (dæmi um algenga hönnun er sýnt á mynd 1). Flæðikerfið skal vera þannig gert að það sé þétt lukt um húðina, auðvelt sé að taka sýni úr viðtökulausninni, sem er í snertingu við neðra borð húðarinnar, og viðtökulausnin blandist vel og unnt sé að hafa góða stjórn á hita kersins og innihaldi þess. Bæði flæðiker fyrir gegnumstreymi og án gegnumstreymis koma til greina. Venjulega eru gjafahólf höfð opin meðan á váhrifum stendur frá takmörkuðum skammti (e. *finite dose*) af prófunarblöndunni. Þegar um ótakmarkaða skammta er að ræða og í sérstökum sviðsmyndum fyrir takmarkaða skammta geta gjafahólf aftur á móti verið lokuð.

1.4.2. **Viðtökuvökvi**

Helst skal nota lífeðlisfræðilega heppilegan viðtökuvökva þótt einnig megi nota aðra vökva, að því tilskildu að notkun þeirra sé rökstudd. Leggja skal fram nákvæmar upplýsingar um samsetningu viðtökuvökvans. Sýna skal fram á fullnægjandi leysni prófunarefnisins í viðtökuvökvanum þannig að hún verki ekki sem tálmi á upptöku. Viðtökuvökvinn má heldur ekki hafa áhrif á heilleika húðhlutans. Í gegnumstreymiskerfi má rennslishraðinn ekki hindra flæði prófunarefnis yfir í viðtökuvökvann. Í keri með kerfi án gegnumstreymis skal hræra stöðugt í vökvanum og taka sýni úr honum reglulega. Ef efnaskipti eru rannsökuð þarf viðtökuvökvinn að geta haldið húðinni lífvænlegri alla tilraunina.

1.4.3. **Húðhlutar (e. *skin preparations*)**

Hægt er að nota húð af mönnum eða dýrum. Viðurkennt er að notkun mannshúðar er með fyrirvara um siðferðilega þætti og skilyrði á lands- og alþjóðavísu. Helst skal nota lífvænlega húð en þó er einnig hægt að nota dauða húð, að því tilskildu að sýnt sé fram á heilleika hennar. Bæði má nota himnur úr húðþekju (klofnar frá með ensímum, hita eða efnrænum aðferðum) eða aðskilin húðlög (venjulega 200–400 μm að þykkt) sem eru unnin með húðhníf. Nota má húð af fullri þykkt en varast skal að hafa hana of þykka (u.þ.b. > 1 mm) nema sérstaklega sé þörf á því fyrir ákvörðun á prófunaríðefninu í einstökum lögum húðarinnar. Rökstyðja þarf val á dýrategundum, skrokkhluta og tækni við undirbúning. Krafist er fullnægjandi gagna úr minnst fjórum samhliða prófunum.

1.4.4. **Heilleiki húðhluta**

Nauðsynlegt er að húðin sé undirbúin á tilhlýðilegan hátt. Óviðeigandi meðhöndlun getur leitt til skemmda á hornlagi húðarinnar og því þarf að hafa eftirlit með heilleika húðhlutans. Þegar efnaskipti húðar eru rannsökuð skal nota nýafskorna húð eins fljótt og unnt er og við skilyrði sem vitað er að styðja efnaskiptavirkni. Að meginreglu til skal nota nýafskorna húð innan 24 klukkustunda en ásættanlegur geymslutími getur verið breytilegur eftir því ensímkerfi, sem kemur við sögu í efnaskiptum, og eftir geymsluhitanum (13. heimild). Hafi húðhlutar verið geymdir fyrir notkun skal leggja fram sannanir um að tálmavirkni þeirra sé óskert.

1.4.5. **Prófunarefni**

Rannsaka á gegnþrengingareiginleika prófunarefnisins. Best er að prófunarefnið sé geislamerkt.

1.4.6. **Prófunarefnablanda**

Prófunarefnablandan (t.d. óblandað, þynnt eða samsett efni sem inniheldur prófunarefnið sem er borið á húðina) skal vera sú sama (eða raunhæf staðgöngublanda hennar) og sú sem menn eða aðrar hugsanlegar marktegundir gætu orðið fyrir váhrifum af. Ef munur er á prófunarefnablöndunni og efnablöndunni sem er í almennri notkun skal það rökstutt.

1.4.7. **Styrkleikar og samsetningar prófunarefna**

Venjulega er prófunarefnið notað í mörgum styrkleikum sem spanna efra svið hugsanlegra váhrifa á menn. Einnig kemur til greina að gera prófanir á úrvali algengra samsetninga.

1.4.8. **Borið á húðina**

Þegar menn verða fyrir váhrifum frá íðefnum við venjulegar aðstæður er yfirleitt um að ræða takmarkaða skammta. Þessvegna skal nota skammta sem líkjast þeim sem menn verða fyrir váhrifum af, venjulega 1–5 mg/cm^2 af húð fyrir föst efni og allt að 10 µl/cm^2 af húð fyrir vökva. Magnið skal rökstyðja með líklegum notkunarskilyrðum, markmiðum rannsóknarinnar eða eðliseiginleikum prófunarblöndunnar. Til dæmis getur áburður á húðyfirborðið verið ótakmarkaður ef mikið magn er borið á hverja flatareiningu.

1.4.9. **Hitastig**

Hitastig hefur áhrif á óvirkt flæði íðefna (og þar með á upptöku þeirra um húð). Viðhalda skal stöðugu hitastigi á flæðihólfinu og húðinni, sem næst eðlilegu hitastigi húðar, 32 ± 1 °C. Mismunandi gerðir flæðikera útheimta mismunandi hitastig á vatnsbaði eða hitaklossa til að tryggja að viðtakinn/húðin sé við sinn lífeðlisfræðilega eðlilegan hita. Rakastigið ætti helst að vera milli 30–70%.

1.4.10. **Váhrifatími og sýnataka**

Unnt er að láta húðina verða fyrir váhrifum frá prófunarblöndunni allan tilraunartímann eða í styttri tíma (þ.e. til að líkja eftir sérstökum tegundum váhrifa á menn). Umframmagn prófunarblöndu er þvegið af húðinni með viðeigandi hreinsiefni og skolvatninu safnað til greiningar. Aðferðin við að fjarlægja prófunarefnið fer eftir líklegum notkunarskilyrðum og skal færa rök fyrir henni. Venjulega er 24 klst. sýnatökutími nauðsynlegur til að unnt sé að lýsa upptökusniðinu á fullnægjandi hátt. Þar eð heilleika húðarinnar getur farið að hnigna eftir 24 klukkustundir skal sýnatökutíminn að jafnaði ekki vera lengri en 24 klukkustundir. Fyrir prófunarefni sem fara hægt í gegnum húðina getur verið þörf á lengri tímum en hugsanlega ekki fyrir prófunarefni sem smjúga hratt í gegn. Tíðni sýnatöku úr viðtökuvökvanum ætti að vera með þeim hætti að unnt sé að setja upptökusnið prófunarefnisins fram á myndrænan hátt.

1.4.11. **Lokaverkferli**

Greina skal alla þætti prófunarkerfisins og ákvarða endurheimt. Þetta á við um gjafahólfið, skolvatnið af húðyfirborðinu, húðhlutann og viðtökuvökvann/viðtökuhólfið. Í sumum tilvikum má skipta húðinni upp í berskjaldað húðsvæði og húðsvæðið undir kraganum á kerinu og í hornhúð, húðþekju og leðurhúð, til aðskilinnar greiningar.

1.4.12. **Greining**

Í öllum rannsóknum þarf að nást fullnægjandi endurheimt (markmiðið skal vera meðaltal upp á 100 ± 10% af geislavirkninni og rökstyðja skal öll frávik). Nota skal viðeigandi aðferð til að greina magn prófunarefnis í viðtökuvökvanum, húðhlutanum, skolvatni af húðyfirborðinu og skoli af búnaði.

2. **GÖGN**

Skýra skal frá greiningu á viðtökuvökva, dreifingu prófunaríðefnisins í prófunarkerfinu og sambandi upptökusniðs og tíma. Þegar váhrifum er beitt við skilyrði sem svara til takmarkaðs skammts skal reikna magnið, sem þvegið er af húðinni, magnið í húðinni (og í hinum ýmsu húðlögum ef þau eru greind) og magnið sem er í viðtökuvökvanum (hraða, sem og magn eða hundraðshluta skammtsins sem er borinn á). Húðupptöku má stundum sýna með því að nota aðeins gögn fyrir viðtökuvökvann. En verði leifar prófunarefnisins eftir í húðinni í lok rannsóknarinnar getur verið nauðsynlegt að taka það með í upptekið heildarmagn (sjá 66. mgr. í 3. heimild). Ef váhrifum er beitt við skilyrði sem svara til ótakmarkaðs skammts kann að vera unnt að nota gögnin til að reikna út gegndræpisstuðul (Kp). Við síðarnefndu skilyrðin skiptir hundraðshluti upptöku ekki máli.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Prófunarskýrslan skal ná yfir kröfurnar, sem mælt er fyrir um í aðferðarlýsingunni, ásamt rökstuðningi fyrir prófunarkerfinu sem er notað, og eftirtaldar upplýsingar skulu vera í skýrslunni:

prófunarefni:

— eðlisástand, eðlisefnafræðilegir eiginleikar (a.m.k. sameindaþyngd og log P_{ow}), hreinleiki (geislaefnafræðilegur hreinleiki),

— auðkennisupplýsingar (t.d. lotunúmer),

— leysni í viðtökuvökva.

Prófunarblanda:

— samsetning og rökstuðningur fyrir notkun,

— einsleitni.

Prófunarskilyrði:

— uppruni og húðsvæði, aðferð við undirbúning, geymsluskilyrði á undan notkun, hvers kyns formeðhöndlun (hreinsun, sýklalyfjameðferð o.s.frv.), mælingar á heilleika húðar, efnaskiptaástand, rökstuðningur fyrir notkun,

— hönnun flæðikers, samsetning viðtökuvökva, flæðihraði viðtökuvökva eða sýnatökutímar og sýnatökuaðferðir,

— upplýsingar um áburð prófunarblöndu og upplýsingar um stærð áburðarskammta,

— váhrifatími,

— upplýsingar um fjarlægingu prófunarblöndunnar af húðinni, t.d. húðskolun,

— upplýsingar um greiningu á húð og alla þá tækni sem hefur verið notuð við uppskiptingu hennar til að sýna dreifingu í húð,

— verkferli við þvott á flæðikeri og búnaði,

— magngreiningaraðferðir, útdráttartækni, greiningarmörk og fullgilding á greiningaraðferð.

Niðurstöður:

— heildarendurheimt í tilrauninni (áborinn skammtur ≡ skol af húð + húð + viðtökuvökvi + skol af flæðikeri),

— endurheimtir frá einstökum flæðikerum og einstökum hólfum, settar upp í töflu,

— upptökusnið,

— upplýsingar um upptöku settar upp í töflu (sýnt sem hraði, magn eða hundraðshluti),

Umfjöllun um niðurstöður.

Niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) Prófunaraðferð B.44. Upptaka um húð: Aðferð með prófun í lífi.

2) OECD, (2002) Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3) OECD, (2000) Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4) Kemppainen B.W. and Reifenrath W.G., (1990) Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5) Bronaugh R.L. and Collier, S.W., (1991) Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, bls. 237-241.

6) Bronaugh R.L. and Maibach H.I., (1991) In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton.

7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, (1993) Monograph No 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W., (1999) Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, bls. 191-205.

9) Recommended Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No 65.

10) Howes, D., Guy, R., Hadgraft, J., Heylings, J.R. et al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

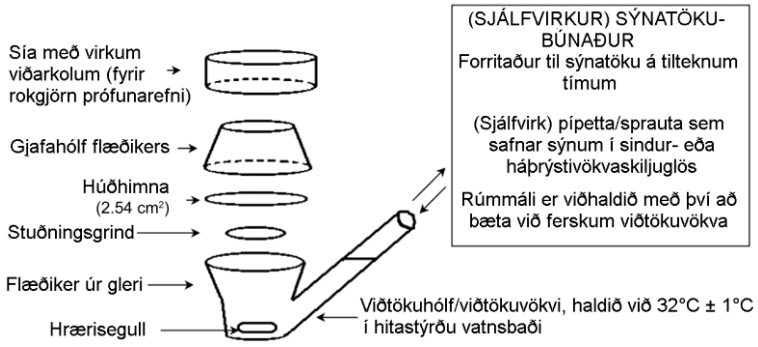
11) Schaefer, H. and Redelmeier, T.E., (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12) Roberts, M.S. and Walters, K.A., (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13) Jewell, C., Heylings, J.R., Clowes, H.M. and Williams, F.M. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74, bls. 356-365.

Mynd 1

Dæmi um algenga hönnun á flæðikeri án gegnumstreymis til rannsókna í glasi á upptöku um húð



C-HLUTI: AÐFERÐIR VIÐ ÁKVÖRÐUN Á VISTEITURHRIFUM

EFNISYFIRLIT

C.1.	BRÁÐ EITURHRIF Á FISK	446
C.2.	DAPHNIA SP. PRÓFUN Á BRÁÐRI SVIPTINGU HREYFIGETU	456
C.3.	VAXTARHÖMLUNARPRÓFUN MEÐ ÞÖRUNGUM	464
C.4.	ÁKVÖRÐUN Á AUÐLÍFBRJÓTANLEIKA	473
I. HLUTI	ALMENN ATRIÐI	473
II. HLUTI	PRÓFUN Á NIÐURBROTI Á UPPLEYSTU, LÍFRÆNU KOLEFNI (Aðferð C.4-A)	480
III. HLUTI	BREYTT OECD-SKIMUNARPRÓFUN (Aðferð C.4-B)	484
IV. HLUTI	PRÓFUN Á KOLTVÍSÝRINGSÚTLOSUN (Aðferð C.4–C)	488
V. HLUTI	ÖNDUNARPRÓFUN MEÐ ÞRÝSTIMÆLINGU (Aðferð C.4-D)	493
VI. HLUTI	PRÓFUN Í LOKAÐRI FLÖSKU (Aðferð C.4-E)	497
VII. HLUTI	M.I.T.I.-PRÓFUN (Aðferð C.4-F)	502
C.5.	NIÐURBROT — LÍFRÆN SÚREFNISÞÖRF	514
C.6.	NIÐURBROT — EFNAFRÆÐILEG SÚREFNISÞÖRF	516
C.7.	NIÐURBROT — NIÐURBROT ÁN TILSTILLIS LÍFVERA VATNSROF SEM FALL AF SÝRUSTIGI	518
C.8.	EITURHRIF Á ÁNAMAÐKA	533
C.9.	LÍFNIÐURBROT — ZAHN-WELLENS PRÓFUN	538
C.10.	LÍFNIÐURBROT — HERMIPRÓFUN MEÐ VIRKRI SEYRU	545
C.11.	LÍFNIÐURBROT — ÖNDUNARHÖMLUN Í VIRKRI SEYRU	559
C.12.	LÍFNIÐURBROT — BREYTT SCAS PRÓFUN	564
C.13.	LÍFÞÉTTNI: GEGNUMSTREYMISPRÓFUN Á FISKUM	571
C.14.	VAXTARPRÓFUN Á UNGFISKI	590
C.15.	FISKUR, PRÓFUN Á SKAMMVINNUM EITURHRIFUM Á FÓSTURVÍSIS-OG KVIÐPOKA-STIGI	603
C.16.	BÝFLUGUR — BRÁÐ EITURHRIF VIÐ INNGJÖF UM MUNN	618
C.17.	BÝFLUGUR — BRÁÐ EITURHRIF VIÐ SNERTINGU	623
C.18.	ÁSOG/AFSOG MEÐ HRISTI- OG SKILVINDUAÐFERÐ	627
C.19.	ÁKVÖRÐUN Á ÁSOGSSTUÐLI (KOC) Í JARÐVEGI OG SKÓLPSEYRU MEÐ HÁÞRÝSTI-VÖKVASKILJUN	666

C.20. ÆXLUNARRÓFUN Á HALAFLÓM (DAPHNIA MAGNA) 674

C.21. ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á KÖFNUNAREFNISUMMYNDUN 693

C.22. ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á KOLEFNISUMMYNDUN 701

C.23. LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ UMMYNDUN Í JARÐVEGI 709

C.24. LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ UMMYNDUN Í VATNASETKERFUM 724

C.1. BRÁÐ EITURHRIF Á FISK

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Tilgangur þessarar prófunar er að ákvarða bráð banvæn eiturhrif efnis á fisk í ferskvatni. Æskilegt er að hafa, eftir því sem hægt er, upplýsingar um vatnsleysni, gufuþrýsting, efnafræðilegan stöðugleika, klofnunarstuðla og lífbrjótanleika efnis til stuðnings við val á þeirri prófunaraðferð sem á best við (kyrrstöðu, hálfkyrrstöðu eða gegnumstreymi) til að tryggja nægilega jafnan styrk prófunarefnisins á prófunartímanum.

Viðbótarupplýsingar (t.d. byggingarformúla, hreinleiki, eðli og hundraðshluti verulegra óhreininda, tilvist og magn aukefna og deilistuðull n-oktanóls/vatns) skulu hafðar til hliðsjónar, bæði við skipulagningu prófunarinnar og túlkun á niðurstöðunum.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Bráð eiturhrif eru þau greinanlegu skaðlegu áhrif sem eru framkölluð í lífveru við stutt váhrif (daga) af efni. Í þessari prófun eru bráð eiturhrif gefin upp sem miðgildisbanastyrkur (LC_{50}) sem er sá styrkur í vatni sem drepur 50% af fiskum í prófunarlotu innan samfellds váhrifatímabils sem verður að tiltaka.

Allir styrkleikar prófunarefnisins eru gefnir upp sem þyngd á móti rúmmáli (milligrömm á lítra). Einnig má sýna þá sem þyngd á móti þyngd (mg/kg^{-1}).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Gera má prófun á viðmiðunarefni til að sýna fram á að við prófunaraðstæðurnar á rannsóknarstofunni hafi ekki orðið marktækar breytingar á svörun hjá þeim tegundum sem eru prófaðar.

Engin viðmiðunarefni eru tilgreind fyrir þessa prófun.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Gera má markprófun með 100 mg á lítra til að sýna fram á að LC_{50} sé hærri en sá styrkur.

Fiskurinn er látinn verða fyrir váhrifum af prófunarefninu, sem er bætt í vatn, í röð styrkbila í 96 klukkustundir. Dánartíðni er skráð á a.m.k. 24 tíma fresti og styrkleiki sem drepur 50% af fisknum (LCso) á hverjum athugunartíma er reiknaður út þar sem hægt er.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Gæðaviðmiðanirnar skulu gilda bæði fyrir markprófunina og heildarprófunaraðferðina.

Dánartíðnin hjá viðmiðunarhópunum má ekki fara yfir 10% í lok prófunarinnar (eða einn fisk ef notaðir er færri en tíu).

Styrkur uppleysts súrefnis skal í allri prófuninni vera meira en 60% af mettunargildi lofts.

Halda skal styrkleikum prófunarefnisins í allt að 80% af upphafsstyrknum í gegnum alla prófunina.

Fyrir efni sem leysast auðveldlega upp í prófunarmiðlinum og gefa stöðugar lausnir, þ.e. þau sem gufa ekki upp svo marktækt sé, brotna ekki niður, vatnsrofna ekki né ásogast, má líta á upphafsstyrkinn sem jafngildan nafnstyrknum. Leggja skal fram gögn um að styrkleikunum hafi verið viðhaldið alla prófunina og að gæðaviðmiðanirnar hafi verið uppfylltar.

Fyrir efni sem:

i. eru torleysanleg í prófunarmiðlinum, eða

ii. geta myndað stöðugar ýrulausnir eða dreifilausnir, eða

iii. eru ekki stöðug í vatnslausnum,

skal líta á upphafsstyrkinn sem styrkinn sem er mældur í lausninni (eða, ef það er ekki tæknilega mögulegt, mældur í vatnssúlunni) í upphafi prófunarinnar. Ákvarða skal styrkinn eftir að jafnvægi hefur náðst en áður en prófunarfiskarnir eru settir í.

Í öllum þessum tilvikum verður að gera frekari mælingar meðan á prófuninni stendur til að staðfesta raunverulega váhrifastyrkleika eða að gæðaviðmiðanirnar hafi verið uppfylltar.

Mismunur á pH skal ekki vera meiri en 1 eining.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Hægt er að nota þrenns konar aðferðir:

Kyrrstöðuprófun:

Prófun á eiturhrifum þar sem ekkert streymi prófunarlausnar á sér stað. (Lausnirnar haldast óbreyttar í gegnum alla prófunina).

Hálfkyrrstöðuprófun:

Prófun án streymis prófunarlausnar en með reglulegri endurnýjun prófunarlausna í lotum (t.d. 24 klst.)

Gegnumstreymisprófun:

Eiturhrifaprófun þar sem vatnið er endurnýjað stöðugt í prófunarhólfunum og íðefnið sem verið er að prófa er flutt með vatninu sem notað er til að endurnýja prófunarmiðilinn.

1.6.1. **Prófefni**

1.6.1.1. Lausnir prófunarefna

Stofnlausnir í nauðsynlegum styrk eru útbúnar með því að leysa efnið upp í afjónuðu vatni eða vatni samkvæmt lið 1.6.1.2.

Valdir prófunarstyrkleikar eru útbúnir með því að þynna stofnlausnina. Ef háir styrkleikar eru prófaðir má leysa efnið upp í þynningarvatninu beint.

Efnin skal almennt aðeins prófa upp að leysnimörkum. Fyrir sum efni (t.d. efni með litla vatnsleysni, hátt P_{ow} eða þau sem mynda stöðuga dreifilausn frekar en eiginlega lausn (e. *true solution*) í vatni) er heimilt að keyra prófunarstyrk yfir leysnimörkum efnisins til að tryggja að hámarks leysni/stöðugur styrkur hafi náðst. Hins vegar er mikilvægt að þessi styrkur trufli prófunarkerfið ekki á annan hátt (t.d. að efnið myndi lag á vatnsyfirborðinu sem hindrar súrefnismettun vatnsins, o.s.frv.).

Nota má úthljóðsdreifingu, lífræna leysa, ýruefni eða dreifiefni til að auðvelda að útbúa stofnlausnir efna með litla vatnsleysni eða til að stuðla að dreifingu þessara efna í prófunarmiðlinum. Þegar slík hjálparefni eru notuð skulu allir prófunarstyrkleikar innihalda sama magn hjálparefnis og fleiri fiskar í viðmiðun látnir verða fyrir váhrifum af sama styrk hjálparefnisins og notaður er í prófunarsyrpunni. Halda skal styrk slíkra hjálparefna í lágmarki, en þau skulu aldrei vera yfir 100 mg í lítra í prófunarmiðlinum.

Prófunina skal framkvæma án sýrustigsstillingar. Ef vísbendingar eru um greinilega breytingu á sýrustigi er mælt með að prófunin sé endurtekin með sýrustigsstillingu og greint frá niðurstöðunum. Í því tilviki skal sýrustigsstilla stofnlausnina til samræmis við sýrustigsgildi þynningarvatnsins nema sérstakar ástæður séu fyrir að gera það ekki. Til þess eru HCl og NaOH æskilegust. Stilla skal sýrustigið á þann hátt að ekki verði marktæk breyting á styrk prófunarefnisins í stofnlausninni. Greina skal frá því ef prófunarefna-sambandið verður fyrir einhverjum efnahvörfum eða eðlisrænum útfellingum vegna stillingarinnar.

1.6.1.2. *Geymslu- og þynningarvatn*

Nota má neysluvatn (ómengað af klór, þungmálmum eða öðrum efnum í styrk sem er mögulega skaðlegur), hágæða náttúrulegt vatn eða endurgert vatn (sjá viðbæti 1). Æskilegt er að vatnið sé með heildar hörku milli 10 og 250 mg/l (sem $CaCO_3$) og með pH frá 6,0 til 8,5.

1.6.2. **Búnaður**

Allur búnaður skal vera úr efnafræðilega óvirku efni:

— sjálfvirkt þynningarkerfi (fyrir gegnumstreymisprófun),

— súrefnismælir,

— búnaður til að ákvarða hörku vatns,

— fullnægjandi búnaður til hitastillingar,

— pH-mælir.

1.6.3. **Prófunarfiskur**

Fiskurinn skal vera heilbrigður og án allra sýnilegra vanskapana.

Tegundirnar sem eru notaðar skal velja á grundvelli hagnýtra viðmiðana, svo sem hvort þær eru fáanlegar allt árið, hvort viðhald er auðvelt, hve vel þær henta til prófunar, hlutfallslegs næmis fyrir íðefnum og allra efnahagslegra, líffræðilegra eða vistfræðilegra þátta sem máli skipta. Þegar fisktegundir eru valdar skal einnig hafa í huga þörfina fyrir að gögnin sem fást verði samanburðarhæf við gildandi alþjóðlega samræmingu (1. heimild).

Í 2. viðbæti er að finna skrá yfir fisktegundir sem mælt er með fyrir framkvæmd þessarar prófunar en sebradanni og regnbogasilungur eru ákjósanlegustu tegundirnar.

1.6.3.1. *Geymsla*

Æskilegt er að prófunarfiskur sé af einum stofni og af svipaðri lengd og á líkum aldri. Fiskinn þarf að halda í minnst 12 daga við eftirfarandi skilyrði:

hleðsla:

viðeigandi fyrir kerfið (hringrás eða gegnumstreymi) og fisktegundina,

vatn:

Sjá 1.6.1.2,

birta:

lýsing í 12 til 16 klst. daglega,

styrkur uppleysts súrefnis:

a.m.k. 80% af mettunargildi lofts,

fóðrun:

þrisvar í viku eða daglega, hætt 24 klukkustundum áður en prófunin hefst.

1.6.3.2. *Dánartíðni*

Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánartíðni og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:

— meira en 10% af þýðinu á sjö dögum:

allri lotunni hafnað,

— milli 5 og 10% af þýðinu:

geymslutímabil lengt um sjö daga í viðbót.

Ef ekki verða frekari dauðsföll má samþykkja lotuna, annars verður að hafna henni,

— minna en 5% af þýðinu:

lotan er samþykkt.

1.6.4. **Aðlögun**

Allur fiskur verður að vera í vatni af sömu gæðum og hitastigi og verður notað í prófuninni í minnst sjö daga áður en hann er notaður.

1.6.5. **Prófunaraðferð**

Á undan endanlegu prófuninni má gera skammtastærðaprófun til að afla upplýsinga um styrkbilin fyrir aðalprófunina.

Í viðbót við prófunarsyrpuna er keyrð ein viðmiðun án prófunarefnisins og, ef við á, ein viðmiðun sem inniheldur hjálparefnið.

Velja skal kyrrstöðu-, hálfkyrrstöðu- eða gegnumstreymisprófun, eins og við á eftir eðlis- og efnafræðilegum eiginleikum prófunarefnasambandsins, til að uppfylla gæðaviðmiðanirnar.

Fiskurinn er látinn verða fyrir váhrifum af efninu eins og lýst er hér að neðan:

— tímalengd: 96 klukkustundir,

— fjöldi dýra: minnst sjö á hvern styrk,

— tankur: með hæfilegt rúmtak miðað við ráðlagða hleðslu,

— hleðsla: fyrir kyrrstöðu- og hálfkyrrstöðuprófun er mælt með 1 g/l sem hámarkshleðslu; meiri hleðsla er ásættanleg fyrir gegnumstreymiskerfi.

— prófunarstyrkur: Minnst fimm styrkleikar með fastan mismunarstuðul, ekki hærri en 2,2, sem spanna eins og mögulegt er 0 til 100% dánartíðni,

— vatn: sjá 1.6.1.2,

— ljós: lýsing í 12 til 16 klst. daglega,

— hitastig: hæfilegt fyrir tegundina (2. viðbætir) en innan ± 1 °C marka í hverri tiltekinni prófun,

— styrkur uppleysts súrefnis: ekki minni en 60% af mettunargildi lofts við valda hitastigið,

— fóðrun: engin.

Fiskurinn er skoðaður eftir fyrstu tvær til fjórar klukkustundirnar og ekki sjaldnar en á 24 klst. fresti. Fiskur telst dauður ef snerting á stirtlu (*caudal peduncle*) vekur enga svörun og engar öndunarhreyfingar eru sjáanlegar. Dauðir fiskar eru fjarlægðir og skráðir þegar þeir finnast. Skrá skal sjáanlegan afbrigðileika (t.d. jafnvægistap, breytingar á sundhegðun, öndunarvirkni, litarhátt, o.s.frv.).

Mælingar á pH, uppleystu súrefni og hitastigi verður að gera daglega.

Markprófun

Með því verkferli sem er lýst í þessari prófunaraðferð má gera markprófun með 100 mg á lítra til að sýna fram á að LC_{50} sé hærri en sá styrkur.

Ef eðli efnisins er þannig að ekki er hægt að ná styrk sem nemur 100 mg/L í prófunarvatninu skal framkvæma markprófunina með styrk sem jafngildir leysni efnisins (eða þeim hámarksstyrk sem myndar stöðuga dreifilausn) í miðlinum sem notaður er (sjá einnig lið 1.6.1.1).

Markprófunina skal framkvæma með sjö til tíu fiskum og sama fjölda í viðmiðunarhópnum eða -hópunum. (Tvíliðusetningin segir til um að ef tíu fiskar eru notaðir og dánartíðni er núll sé 99,9 % öruggt að LC_{50} sé hærra en styrkurinn sem er notaður í markprófuninni. Ef 7, 8 eða 9 fiskar eru notaðir og dánartíðnin engin veitir það a.m.k. 99 % öryggi um að LC_{50} sé hærra en styrkurinn sem er notaður).

Ef dauðsföll verða skal gera fullnaðarrannsókn. Verði nær banvænna áhrifa vart skulu þau skráð.

2. **GÖGN OG MAT**

Teikna skal hundraðshluta dánartíðni fyrir hvert ráðlagt váhrifatímabil á móti styrk á lograðan líkindapappír fyrir hvert tímabil með skráðum athugunum (24, 48, 72 og 96 klst.).

Áætla skal LC_{50} og öryggismörkin (p = 0,05) með stöðluðum aðferðum þegar mögulegt er og fyrir hvern athugunartíma; þessi gildi skal námunda í eina eða í mesta lagi tvær marktækar tölur (dæmi um námundun í tvær tölur: 170 fyrir 173,5; 0,13 fyrir 0,127; 1,2 fyrir 1,21).

Ef hallatala svörunarferilsins fyrir styrk/hundraðshluta er of há til að hægt sé að reikna út LC_{50} nægir að áætla þetta gildi myndrænt.

Þegar tveir samliggjandi styrkleikar með 2,2 hlutfall innbyrðis gefa aðeins 0 og 100% dánartíðni, veita þessi tvö gildi fullnægjandi mælikvarða á það svið sem LC_{50} fellur innan.

Ef fram kemur að ekki er hægt að viðhalda stöðugleika og einsleitni prófunarefnisins, skal skrá það og fara gætilega við túlkun á niðurstöðunum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— upplýsingar um prófunarfisk (vísindaheiti, stofn, birgir, öll formeðhöndlun, stærð og fjöldi sem notaður er við hvern prófunarstyrk),

— uppruni þynningarvatns og helstu efnafræðilegir eiginleikar (pH, harka, hitastig),

— aðferð við tilreiðslu á stofn- og prófunarlausnum ef um er að ræða efni með litla vatnsleysni,

— styrkur allra hjálparefna,

— listi yfir styrkleika sem notaðir eru og allar fyrirliggjandi upplýsingar um stöðugleikann við þá styrkleika prófaða íðefnisins í prófunarlausninni,

— aðferðir sem notaðar eru og fengnar niðurstöður ef efnagreiningar eru gerðar,

— niðurstöður markprófunar ef slík er gerð,

— ástæður fyrir vali og upplýsingar um prófunaraðferðina sem er notuð (t.d. kyrrstaða, hálfkyrrstaða, skömmtunarhraði, gegnumstreymishraði, loftun, hleðsla fisks, o.s.frv.),

— lýsing á prófunarbúnaði,

— fyrirkomulag lýsingar,

— styrkur uppleysts súrefnis, pH gildi og hitastig prófunarlausna á 24 klst. fresti,

— gögn um að gæðaviðmiðanir hafi verið uppfylltar,

— tafla sem sýnir uppsafnaða dánartíðni við hvern styrk og í viðmiðunarhópnum (og viðmiðunarhópnum með hjálparefninu ef þarf) á öllum ráðlögðu athugunartímunum,

— línurit sem sýnir svörunarferil styrks/hundraðshluta við lok prófunarinnar,

— LC_{50}- gildin við hvern ráðlögðu athugunartímanna (með 95% öryggismörkum) ef hægt er,

— tölfræðilegar aðferðir sem eru notaðar við ákvörðun á LC_{50}- gildunum,

— niðurstöðurnar sem fengust ef viðmiðunarefni er notað,

— hæsti prófunarstyrkur sem veldur engri dánartíðni innan tímabils prófunarinnar,

— lægsti prófunarstyrkur sem veldur 100% dánartíðni innan tímabils prófunarinnar,

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to Brachydanio rerio — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to Salmo gairdneri — Static and Flow — Through methods — NFT 90-305 June 1985.

4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan-Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden -Part II 1974.

6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38412 (11) und 1 (15).

7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia reticulata, 1980.

9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF,1975.

13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicityof a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

15) Litchfield, J. T.and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm, tExp. Therap., 1949, vol. 96,99.

16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3,793-821.

18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.

19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634,1977, 65-84.

20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

1. viðbætir

Endurgert vatn

Dæmi um hentugt þynningarvatn

Öll íðefni verða að vera af greiningarhreinleika.

Vatnið skal vera eimað vatn af miklum gæðum eða afjónað vatn með eðlisleiðni minni en 5 μScm^{-1}.

Í eimingarbúnaði fyrir vatnið mega ekki vera neinir hlutar úr kopar.

Stofnlausnir

$CaCI_2 – 2H_2O$ (kalsíumklóríðdíhýdrat):	11,76 g
Leysið upp í vatni svo að verði 1 lítri.	
$MgSO_4 – 7H_2O$ (magnesíumsúlfatheptahýdrat):	4,93 g
Leysið upp í vatni svo að verði 1 lítri.	
$NaHCO_3$ (natríumvetniskarbónat):	2,59 g
Leysið upp í vatni svo að verði 1 lítri.	
KCl (kalíumklóríð):	0,23 g
Leysið upp í vatni svo að verði 1 lítri.	

Endurgert þynningarvatn

Blandið 25 ml af hverri af stofnlausnunum fjórum saman og fyllið með vatni upp að 1 lítra.

Loftblandið þar til styrkur uppleysts súrefnis jafngildir mettunargildi loftsins.

Sýrustigið skal vera 7,8 ± 0,2.

Ef nauðsyn krefur skal sýrustigsstilla með NaOH (natríumhýdroxíði) eða HCl (saltsýru).

Þynningarvatnið sem þannig er tilreitt er látið standa í um 12 klst. og má ekki loftblanda frekar.

Summa kalsíum- og magnesíumjóna í þessari lausn er 2,5 mmól á lítra. Hlutfall kalsíumjóna á móti magnesíumjónum er 4:1 og natríumjóna á móti kalíumjónum 10:1. Heildarbasavirkni þessarar lausnar er 0,8 mmól á lítra.

Frávik við tilreiðslu þynningarvatnsins mega ekki breyta samsetningu eða eiginleikum vatnsins.

2. viðbætir

Ráðlagðar prófunarfisktegundir

Ráðlagðar tegundir	Ráðlagt svið prófunarhitastigs (°C)	Ráðlögð heildarlengd tilraunadýrs (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebradanni	20 til 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Breiðkollur	20 til 24	5,0 ± 2,5
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Vatnakarpi	20 til 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck og Schlege 1850) Roðakilli	20 til 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Gúbbi	20 til 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) Röðulborri	20 til 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regnbogasilungur	12 til 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) Gullgægir	20 til 24	6,0 ± 2,0

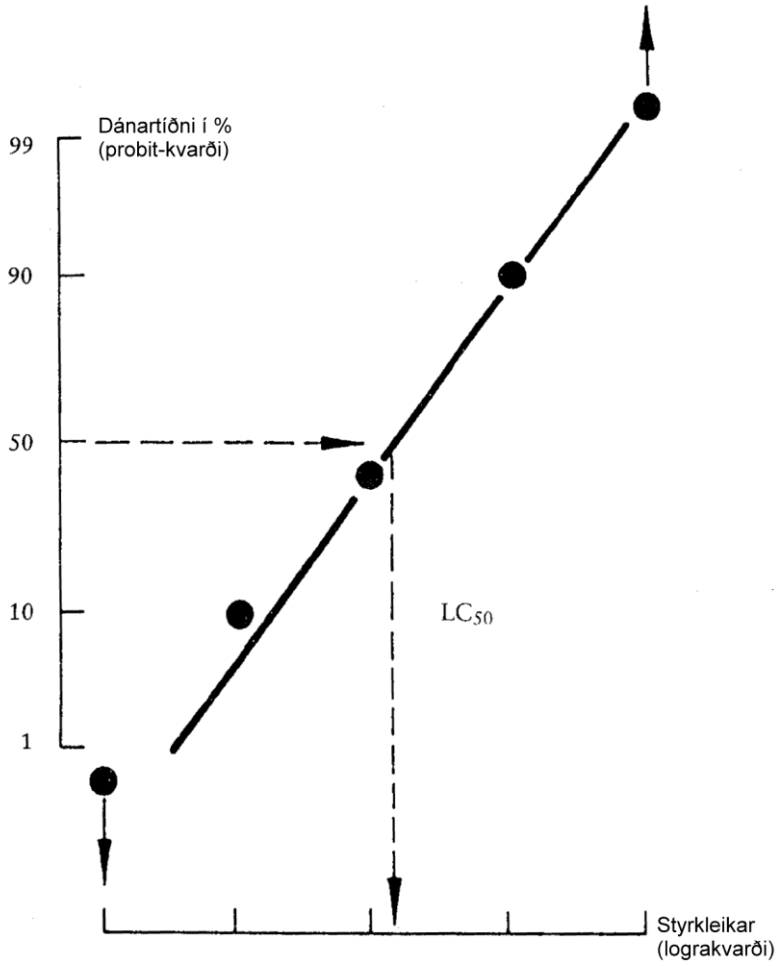
Sýnataka

Fiskarnir sem eru taldir upp hér að ofan eru auðveldir í eldi og/eða víða fáanlegir allt árið. Unnt er að fjölga þeim og rækta þá, annaðhvort í fiskeldisstöðvum eða á rannsóknarstofunni, við stýrð skilyrði að því er varðar sjúkdóma og sníkjudýr svo að prófunarfiskurinn verður heilbrigður og ætterni hans þekkt. Þessir fiskar eru fáanlegir víða um heim.

3. viðbætir

Dæmi um styrk: hundraðshluti dánartíðni

Dæmi um ákvörðun á LC_{50} með log-probit pappír



C.2. DAPHNIA SP. PRÓFUN Á BRÁÐRI SVIPTINGU Á HREYFIGETU

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun, bráð svipting hreyfigetu, jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 202 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Í þessari aðferð er lýst prófun fyrir bráðum eiturhrifum til að meta áhrif íðefna á halaflær. Prófunaraðferðir sem til voru, voru notaðar að því marki sem hægt var (1., 2. og 3. heimild).

1.2. SKILGREININGAR

Í tengslum við þessa aðferð eru notaðar eftirfarandi skilgreiningar:

EC_{50}: styrkur sem áætlað er að svipti 50% af halaflónum hreyfigetu innan tiltekins váhrifatímabils. (Sé önnur skilgreining notuð skal gera grein fyrir henni og vísa til heimildarinnar um hana.)

Hreyfigetusvipting: þau dýr sem ekki geta synt innan 15 sekúndna eftir að prófunarílátið hefur verið hrist varlega eru talin svipt hreyfigetu (jafnvel þótt þau geti enn hreyft fálmarana).

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ungar halaflær, yngri en 24 klukkustunda við upphaf prófunarinnar, eru látnar verða fyrir váhrifum af prófunarefninu í röð styrkleika í 48 klst. Hreyfigetusvipting er skráð eftir 24 klst. og 48 klst. og borin saman við samanburðargildi. Niðurstöðurnar eru greindar í þeim tilgangi að reikna út EC_{50} við 48 klst. (sjá lið 1.2 fyrir skilgreiningar). Ákvörðun á EC_{50} við 24 klst. er valkvæð.

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Vatnsleysni og gufuþrýstingur prófunarefnisins skulu vera þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð fyrir magngreiningu efnisins í prófunarlausnunum, með skráða endurheimtargetu og magngreiningarmörk, fyrir hendi. Gagnlegar upplýsingar eru m.a. byggingarformúlan, hreinleiki efnisins, stöðugleiki í vatni eða birtu, P_{ow} og niðurstöður úr prófun á auðlífbrjótanleika (sjá aðferð C.4).

Athugasemd: leiðbeiningar um prófun á efnum sem hafa eðlisefnafræðilega eiginleika sem gerir erfitt um vik að framkvæma prófunina eru í 4. heimild.

1.5. VIÐMIÐUNAREFNI

Prófa má fyrir EC_{50} á viðmiðunarefni til að tryggja að prófunarskilyrðin séu áreiðanleg. Mælt er með eituefnum sem eru notuð í alþjóðlegum hringprófunum (1. og 5. heimild) í þessum tilgangi ([1]). Prófun, eða prófanir, með viðmiðunarefni skal helst gera í hverjum mánuði og a.m.k. tvisvar á ári.

1.6. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Til að prófunin sé gild þurfa eftirfarandi skilyrði að vera uppfyllt:

— ekki meira en 10% halaflónna í samanburðarhópnum eru sviptar hreyfigetu, þ.m.t. í samanburðarhópnum sem inniheldur uppleysandi efnið,

— styrkur uppleysts súrefnis í lok prófunarinnar skal vera ≥ 3 mg/l í samanburðar- og prófunarílátunum.

([1]) Niðurstöðurnar úr þessum prófunum milli rannsóknarstofa og tæknileg leiðrétting á ISO 6341 gefa EC_{50} — 24 klst. fyrir kalíumdíkrómat ($K_2Cr_2O_7$) innan bilsins 0,6 mg/l til 1,7 mg/l.

Athugasemd: Að því er varðar fyrsta skilyrðið skulu ekki meira en 10% af flónum í samanburðarhópnum sýna sviptingu á hreyfigetu eða önnur merki um veikindi eða streitu, t.d. óeðlilegan lit eða óvenjulegt atferli s.s. að festast upp við vatnsyfirborð.

1.7. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.7.1. **Búnaður**

Prófunarílát og annar búnaður sem kemst í snertingu við prófunarlausnirnar skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Prófunarílátin eru venjulega tilraunaglös eða bikarglös úr gleri; þau skal hreinsa fyrir hverja notkun með hefðbundnum rannsóknarstofuaðferðum. Prófunarílátin skal hylja lauslega til að draga úr vatnstapi vegna uppgufunar og til að forðast að ryk berist í lausnirnar. Rokgjörn efni skal prófa í alveg fylltum, lokuðum ílátum, nægilega stórum til að hindra að súrefni verði takmarkandi eða of lítið (sjá lið 1.6 og fyrstu mgr. liðar 1.8.3).

Að auki verða sum eða öll eftirfarandi tæki notuð: súrefnismælir (með örskauti eða öðrum hentugum búnaði til að mæla uppleyst súrefni í sýnum með lítið rúmmál), sýrustigsmælir, fullnægjandi tæki fyrir hitastýringu, búnaður til að ákvarða heildarstyrk lífræns kolefnis (TOC), búnaður til að ákvarða efnafræðilega súrefnisþörf (COD), búnaður til að ákvarða hörku, o.s.frv.

1.7.2. **Prófunarlífvera**

Daphnia magna Straus er ákjósanlegasta prófunartegundin þótt hægt sé að nota aðrar hentugar tegundir halaflóa í þessari prófun (t.d. *Daphnia pulex*). Í upphafi prófunarinnar skulu halaflærnar vera minna en 24 klukkustunda gamlar og til að draga úr breytileika er sterklega mælt með að þær séu ekki afkvæmi fyrsta klaks. Þær skulu vera úr heilbrigðum stofni (þ.e. ekki sýna nein merki um streitu, s.s. háa dánartíðni, karldýr eða söðulhýði (ephippia) og ekki má vera um að ræða síðbúið fyrsta klak eða dýr með breyttum lit o.s.frv.) Allar lífverur sem notaðar eru við tiltekna prófun skulu eiga uppruna sinn í ræktum sem er komið á úr sama stofni halaflóa. Stofndýrin skulu haldin við sambærileg ræktunarskilyrði (birtu, hitastig, miðil) og þau sem notuð verða í prófuninni. Það eru góðar starfsvenjur að hafa aðlögunartímabil fyrir prófunina ef ræktunarmiðill halaflónna sem á að nota í prófuninni er öðruvísi en sá sem er venjulega notaður venjubundinn er við ræktun halaflóa. Til að gera það skal halda ungviði halaflóa í þynningarvatni við prófunarhitastigið í a.m.k. 48 klukkustundir áður en prófunin hefst.

1.7.3. **Eldis- og þynningarvatn**

Náttúrulegt vatn (yfirborðs- eða grunnvatn), endurgert vatn eða afklórað kranavatn er ásættanlegt sem eldis- og þynningarvatn ef halaflær lifa í því meðan á ræktun, aðlögun og prófun stendur án þess að sýna streitumerki. Allt vatn sem er í samræmi við efnafræðilega eiginleika ásættanlegs þynningarvatns, eins og tilgreint er í 1. viðbæti, er ásættanlegt sem prófunarvatn. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. Endurgert vatn er hægt að gera með því að bæta tilteknu magni prófefna af viðurkenndum greiningarhreinleika út í afjónað eða eimað vatn. Dæmi um endurgert vatn eru gefin í 1. og 6. heimild og í 2. viðbæti. Athugið að forðast skal miðla sem innihalda klóbindla, s.s. miðlana M4 og M7 í 2. viðbæti, við prófanir á efnum sem innihalda málma. pH-gildi skal vera á bilinu 6 til 9. Mælt er með hörku milli 140 og 250 mg/l (sem $CaCO_3$) fyrir Daphnia magna en minni harka getur einnig verið við hæfi fyrir aðrar tegundir halaflóa. Þynningarvatnið má loftblanda áður en það er notað við prófunina til að uppleysta súrefnið hafi náð mettunarstyrk.

Ef náttúrulegt vatn er notað skal mæla gæðaeiginleika vatnsins a.m.k. tvisvar á ári eða ef grunur leikur á að þessir eiginleikar kunni að hafa breyst verulega. (sjá fyrri málsgrein og 1. viðbæti). Einnig skal gera mælingar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ef notað er afklórað kranavatn er æskilegt að gera daglega greiningu á klór. Ef þynningarvatnið er tekið úr yfirborðs- eða grunnvatni skal mæla leiðni og heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) eða efnafræðilega súrefnisþörf (COD).

1.7.4. **Prófunarlausnir**

Prófunarlausnir af þeim styrk, sem valinn er hverju sinni, fást yfirleitt með því að þynna stofnlausn. Æskilegt er að tilreiða stofnlausnir með því að leysa prófunarefnið upp í þynningarvatninu. Forðast skal notkun leysa,ýruefna og dreifiefna eins og unnt er. Í tilteknum tilvikum kann þó að vera nauðsynlegt að nota slík efnasambönd til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Leiðbeiningar um hentuga leysa, ýruefni og dreifiefni eru gefnar í 4. heimild. Prófunarefnið í prófunarlausnunum skal þó aldrei fara yfir leysnimörkin í þynningarvatninu.

Prófunina skal framkvæma án sýrustigsstillingar. Ef pH-gildið helst ekki á bilinu 6–9 má gera aðra prófun og sýrustigstilla stofnlausnina saman við sýrustig þynningarvatnsins áður en prófunarefninu er bætt í. Sýrustigsstillinguna skal gera þannig að ekki verði marktæk breyting á styrk stofnlausnarinnar og að hún valdi engum efnahvörfum á prófunarefninu eða útfellingum úr því. HCl og NaOH eru æskilegust.

1.8. VERKFERLI

1.8.1. **Váhrifaskilyrði**

1.8.1.1. *Prófunar- og samanburðarhópar*

Prófunarílát eru fyllt með viðeigandi magni af þynningarvatni og lausnum af prófunarefni. Rúmmáls-hlutfall lofts/vatns í ílátinu skal vera jafnt fyrir prófunar- og samanburðarhóp. Halaflóm er síðan komið fyrir í prófunarílátunum. Nota skal minnst 20 dýr, helst skipt upp í fjóra hópa með 5 dýrum í hverjum, fyrir hvern prófunarstyrk og fyrir samanburðarhópana. Hafa skal minnst 2 ml af prófunarlausn fyrir hvert dýr (þ.e. rúmmál upp á 10 ml fyrir fimm halaflær í hverju prófunaríláti). Prófunina má framkvæma með því að nota kerfi með hálfkyrrstæðri endurnýjun eða gegnumstreymi ef styrkur prófunarefnisins er ekki stöðugur.

Keyra skal eina samanburðarröð með þynningarvatninu og einnig, ef við á, eina samanburðarröð með uppleysandi efninu, til viðbótar við meðferðarraðirnar.

1.8.1.2. *Prófunarstyrkleikar*

Gera má skammtastærðaprófun til að ákvarða röð styrkleika fyrir endanlegu prófunina nema upplýsingar um eiturhrif prófunarefnisins liggi fyrir. Í þessum tilgangi eru halaflærnar látnar verða fyrir váhrifum af prófunarefninu í röð styrkleika sem liggja langt hver frá öðrum. Fimm halaflær skulu látnar verða fyrir váhrifum af hverjum prófunarstyrk í 48 klst. eða minna og engar samhliða prófanir eru nauðsynlegar. Váhrifatímabilið má stytta (t.d. í 24 klst. eða minna) ef hægt er að fá gögn sem henta vegna skammtastærðaprófunarinnar á styttri tíma.

Nota skal a.m.k. fimm prófunarstyrkleika. Þeim skal raðað í jafnhlutfallaröð og æskilegt er að bilin milli þeirra greinist að með stuðli sem fer ekki yfir 2,2. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Æskilegt er að hæsti styrkurinn sem prófaður er leiði til 100% sviptingar á hreyfigetu og að lægsti styrkurinn hafi ekki nein merkjanleg áhrif.

1.8.1.3. *Skilyrði sem sýni er látið standa við*

Hitastigið skal vera innan bilsins 18 til 22 °C og í hverri einstakri prófun skal það vera stöðugt innan ± 1 °C. Mælt er með hringrás með 16 klst. af birtu og 8 klst. af myrkri. Algert myrkur er einnig ásættanlegt, einkum fyrir prófunarefni sem eru óstöðug í birtu.

Ekki má lofta prófunarílátin meðan á prófuninni stendur. Prófunin er framkvæmd án sýrustigsstillingar. Ekki skal fóðra halaflærnar meðan á prófuninni stendur.

1.8.1.4. *Lengd*

Prófunin skal standa í 48 klukkustundir.

1.8.2. **Athuganir**

Farið skal yfir hvort það eru hreyfigetusviptar halaflær í hverju prófunaríláti þegar 24 og 48 klst. hafa liðið frá upphafi prófunarinnar (sjá skilgreiningar í lið 1.2). Auk hreyfigetusviptingar skal greina frá öllu óeðlilegu atferli eða útliti.

1.8.3. **Mælingar vegna greiningar**

Uppleyst súrefni og sýrustig er mælt við upphaf og lok prófunarinnar í samanburðarhópnum, eða -hópunum, og í hæsta prófunarefnisstyrknum. Styrkur uppleysts súrefnis í samanburðarhópunum skal vera í samræmi við gildisviðmiðunina (sjá lið 1.6). Sýrustig ætti ekki að jafnaði að breytast meira en um 1,5 einingar í neinni prófun. Hitastigið er venjulega mælt í samanburðarílátum eða í andrúmslofti og æskilegt er að það sé skráð samfellt meðan á prófuninni stendur eða, að lágmarki, við upphaf og lok prófunarinnar.

Styrkur prófunarefnisins skal mældur við mesta og minnsta prófunarstyrk, að lágmarki, við upphaf og lok prófunarinnar (4. heimild). Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef unnt að sýna fram á að styrkur prófunarefnisins hafi haldist á fullnægjandi hátt innan ± 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó grundvallast á nafngildum eða mældum upphafsgildum.

1.9. MARKPRÓFUN

Með verkferlinu sem lýst er í þessari aðferð má gera markprófun með 100 mg/l af prófunarefninu, eða með sem nemur allt að leysnimörkum þess í prófunarmiðlinum (hvort sem er lægra), til að sýna fram á að EC_{50} sé hærri en sá styrkur. Markprófunina skal framkvæma með 20 halaflóm (helst skipt í fjóra hópa með fimm dýrum), með sama fjölda í samanburðarhópnum eða -hópunum. Ef einhver hreyfigetusvipting verður skal gera fullnaðarrannsókn. Skrá skal allt óeðlilegt atferli sem vart verður við.

2. **GÖGN**

Gögn skulu tekin saman í töflu og fyrir hvern meðferðar- og samanburðarhóp skal sýna fjölda halaflóa sem eru notaðar og hreyfigetusviptingu við hverja athugun. Hreyfigetusvipting við 24 klst. og 48 klst., í hundraðshlutum, á móti prófunarstyrkleikum er teiknuð upp. Gögn eru greind með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu o.s.frv.) til að reikna út hallatölur ferlanna og EC_{50} með 95% öryggismörkum (p = 0,05) (7. og 8. heimild).

Þegar ekki er hægt að beita staðalaðferðum fyrir útreikning á EC_{50} á gögnin sem fást skal nota mesta styrk sem veldur engri hreyfigetusviptingu og minnsta styrkinn sem veldur 100% hreyfigetusviptingu sem nálgun fyrir EC_{50} (þetta telst vera faldmeðaltalið fyrir þessa tvo styrki).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— eðlisástand og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki.

Prófunartegundir:

— uppruni og tegundir halaflóa, birgir (ef hann er þekktur) og ræktunarskilyrðin sem notuð eru (þ.m.t. uppruni, tegund og magn af fæðu, hve oft er fóðrað).

Prófunarskilyrði:

— lýsing á prófunarílátunum: gerð íláta, rúmmál lausnar, fjöldi halaflóa í hverju prófunaríláti, fjöldi prófunaríláta (samhliða prófanir) fyrir hvern styrk,

— aðferðir við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna, þ.m.t. öll notkun leysa eða dreifiefna, styrkleikar sem notaðir eru,

— upplýsingar um þynningarvatn: uppruni og eiginleikar sem varða vatnsgæði (pH, harka, Ca/Mg hlutfall, Na/K hlutfall, basavirkni, eðlisleiðni, o.s.frv.); samsetning á endurgerðu vatni ef það er notað,

— skilyrði sem sýnið er látið standa við, birtustyrkur og birtutímabil, uppleyst súrefni, sýrustig, o.s.frv.

Niðurstöður:

— fjöldi og hundraðshluti halaflóa sem voru sviptar hreyfigetu eða sýndu merki um einhver skaðleg áhrif (þ.m.t. óeðlilegt atferli) í samanburðarhópunum og í hverjum meðferðarhóp á hverjum athugunartíma og lýsing á eðli áhrifanna sem komu fram,

— niðurstöður og dagsetning prófunar sem er gerð með viðmiðunarefni, ef fyrirliggjandi,

— nafnstyrkleikar í prófuninni og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunarefnisins í prófunarílátunum; einnig skal greina frá endurheimtargetu aðferðarinnar og magngreiningarmörkum,

— allar eðlisefnafræðilegar mælingar á hita- og sýrustigi og uppleystu súrefni sem gerðar eru meðan á prófuninni stendur,

— EC_{50} við 48 klst. fyrir hreyfigetusviptingu með öryggisbilum og línuritum aðlagaða líkansins sem er notað við þá útreikninga, hallatölur fyrir ferla skammtasvörunar og staðalfrávik þeirra; tölfræðiaðferðir sem eru notaðar fyrir ákvörðun á EC_{50} (einnig skal greina frá þessum gagnaatriðum fyrir hreyfigetusviptingu við 24 klst. ef þeir voru mældir),

— útskýringar á öllum frávikum frá Testig-aðferðinni og hvort frávikin hafi haft áhrif á niðurstöður prófunarinnar.

4. **HEIMILDIR**

1) ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using Daphnia spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No 23. Paris 2000.

5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to Daphnia.

6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: Daphnia magna Reproduction Test, adopted September 1998.

7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. bls. 65-84

8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

1. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR ÁSÆTTANLEGS ÞYNNINGARVATNS

Efni	Styrkur
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarmagn lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

2. viðbætir

DÆMI UM HENTUGT ENDURGERT PRÓFUNARVATN

ISO prófunarvatn (1)

Stofnlausnir (stakt efni)		Endurgerða vatnið er tilreitt með því að bæta eftirfarandi magni af stofnlausnum í 1 lítra af vatni (*)
Efni	Magn sem bætt er í 1 lítra af vatni (*)	
kalsíumklóríð $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
magnesíumsúlfat $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
natríumbíkarbónat $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
kalíumklóríð KCl	0,23 g	25 ml

(*) Vatn af viðeigandi hreinleika, t.d. afjónað, eimað eða þrýstisíað yfir himnu, með eðlisleiðni sem er æskilegt að sé ekki yfir 10 $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Elendt M7- og M4-miðlar

Aðlögun að miðlunum Elendt M7 og M4

Á sumum rannsóknarstofum hefur reynst erfitt að flytja halaflær beint yfir í miðlana M4 og M7. Nokkur árangur hefur hins vegar náðst með hægfara aðlögun, þ.e. að flytja halaflærnar beint úr eigin miðli yfir í 30% Elendt, því næst yfir í 60% Elendt og þá í 100% Elendt. Aðlögunartíminn getur þurft að vera allt að einum mánuði.

Undirbúningur

Snefilefni

Aðskildar stofnlausnir (I) einstakra snefilefna eru fyrst tilreiddar í vatni af viðeigandi hreinleika, t.d. afjónuðu, eimuðu eða þrýstisíuðu yfir himnu. Úr þessum mismunandi stofnlausnum (I) er tilreidd önnur stök stofnlausn (II) sem inniheldur öll snefilefnin (samsett lausn), þ.e.:

Stofnlausn(ir) I (stakt efni)	Magn sem bætt er í vatn (mg/l)	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4)	Til að tilreiða samsetta stofnlausn II skal bæta eftirfarandi magni af stofnlausn I við vatn (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-falt	1,0	0,25
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7 210	20 000-falt	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-falt	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-falt	1,0	0,25
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	3 040	20 000-falt	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-falt	1,0	0,25
Na_2 $MoO_4 \cdot 2H_2O$	1 230	20 000-falt	1,0	0,25
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	335	20 000-falt	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-falt	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-falt	1,0	1,0

Stofnlausn(ir) I (stakt efni)	Magn sem bætt er í vatn (mg/l)	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4)	Til að tilreiða samsetta stofnlausn II skal bæta eftirfarandi magni af stofnlausn I við vatn (ml/l)	
			M4	M7
KI	65	20 000-falt	1,0	1,0
$Na_2 SeO_3$	43,8	20 000-falt	1,0	1,0
$NH_4 VO_3$	11,5	20 000-falt	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-falt	—	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 991	2 000-falt	—	—
Lausnirnar Na_2-EDTA og $FeSO_4$ eru tilreiddar hvor fyrir sig, þeim hellt saman og þær gufusæfðar þegar í stað. Það gefur:				
2 l Fe-EDTA-lausn		1 000-falt	20,0	5,0

Miðlarnir M4 og M7

Miðlarnir M4 og M7 eru tilreiddir með stofnlausn II, nauðsynlegum frumefnum og vítamínum sem hér segir:

	Magn sem bætt er í vatn (mg/l)	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4)	Magn stofnlausnar II sem bætt er við til að útbúa miðilinn (ml/l)	
			M4	M7
Stofnlausn II (samsett snefilefni)		20-falt	50	50
Stofnlausnir með helstu næringarefnum (stakt efni)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-falt	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-falt	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-falt	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-falt	1,0	1,0
$Na_2 SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-falt	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-falt	0,1	0,1
$KH_2 PO_4$	1 430	10 000-falt	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-falt	0,1	0,1
Samsett vítamínstofnlausn	—	10 000-falt	0,1	0,1
Samsetta vítamínstofnlausnin er tilreidd með því að bæta vítamínunum þremur í 1 lítra af vatni sem hér segir:				
Þíamínhýdróklóríð	750	10 000-falt		
Sýanókóbalamín (B_{12})	10	10 000-falt		
Bíótín	7,5	10 000-falt		

Samsetta vítamínstofnlausnin er geymd frosin í litlum deiliskömmtum. Vítamínunum er bætt við miðilinn skömmu fyrir notkun.

Ath. Til að koma í veg fyrir að sölt falli út við tilreiðslu fullgerða miðilsins skal bæta deiliskömmtum af stofnlausnum út í u.þ.b. 500–800 ml af afjónuðu vatni og fylla síðan upp í 1 lítra.

Ath. fyrsta útgefna efni um miðilinn M4 má finna í Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

C.3. VAXTARHÖMLUNARPRÓFUN MEÐ ÞÖRUNGUM

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með þessari prófun er að ákvarða áhrif efnis á vöxt einfruma grænþörungategunda. Með tiltölulega stuttum prófunum (72 klukkustunda) er hægt að meta áhrifin yfir nokkrar kynslóðir. Þessa aðferð er hægt að laga að notkun margra tegunda einfruma þörunga en í þeim tilvikum verður lýsing á aðferðinni að fylgja í prófunarskýrslunni.

Auðveldast er að nota þessa prófunaraðferð með vatnsleysnum efnum sem líklegt er að verði eftir í vatninu við prófunarskilyrðin.

Aðferðina er hægt að nota fyrir efni sem hafa ekki bein áhrif á mælingar á þörungavexti.

Æskilegt er að hafa, eftir því sem hægt er, upplýsingar um vatnsleysni, gufuþrýsting, efnafræðilegan stöðugleika, klofnunarstuðla og lífbrjótanleika efnisins áður en byrjað er á prófuninni.

Viðbótarupplýsingar (t.d. byggingarformúla, hreinleikastig, eðli og hundraðshluti verulegra óhreininda, tilvist og magn aukefna og deilistuðull n-oktanóls/vatns) skulu hafðar til hliðsjónar, bæði við skipulagningu prófunarinnar og túlkun á niðurstöðunum.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Frumuþéttleiki: fjöldi frumna í millilítra.

Vöxtur: aukning á frumuþéttleika á prófunartímabilinu.

Vaxtarhraði: aukning á frumuþéttleika á tímaeiningu.

EC_{50}: í þessari aðferð, sá styrkur prófunarefnis sem leiðir til 50% minnkunar á annað hvort vexti (E_bC_{50}) eða vaxtarhraða (E_rC_{50}) í hlutfalli við samanburðarhópinn.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): í þessari aðferð, hæsti styrkur sem er prófaður án þess að marktæk hömlun á vexti miðað við samanburðarhópinn komi fram.

Allir styrkir prófunarefnisins eru gefnir sem þyngd á móti rúmmáli (milligrömm í lítra). Einnig má gefa þá upp sem þyngd á móti þyngd (mg/kg^{-1}).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Gera má prófun með viðmiðunarefni til að sýna fram á að ekki hafi orðið marktækar breytingar á næmi prófunartegundanna við prófunarskilyrði á rannsóknarstofunni.

Ef viðmiðunarefni er notað skal greina frá niðurstöðunum í prófunarskýrslunni. Hægt er að nota kalíumdíkrómat sem viðmiðunarefni en litur þess getur haft áhrif á gæði og styrk ljóssins sem frumurnar fá og einnig á ákvarðanir með litrófsmælingum ef þær eru gerðar. Kalíumdíkrómat hefur verið notað í alþjóðlegri fjölsetraprófun (sjá 3. heimild og 2. viðbæti).

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Gera má markprófun með 100 mg á lítra til að sýna fram á að EC_{50} sé hærri en sá styrkur.

Ræktir valinna grænþörunga í veldisvexti eru látnir verða fyrir váhrifum af ýmsum styrkleika prófunarefnisins yfir nokkrar kynslóðir við skilgreindar aðstæður.

Prófunarlausnirnar eru ræktaðar í 72 klukkustundir og á meðan er frumuþéttnin í hverri lausn mæld a.m.k. einu sinni á hverjum 24 klst. Hömlun á vexti með tilliti til samanburðarræktar er ákvörðuð.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Gæðaviðmiðanirnar skulu gilda bæði fyrir markprófunina og heildarprófunaraðferðina.

Frumuþéttnin í samanburðarræktunum ætti að hafa aukist um stuðul upp á minnst 16 innan þriggja daga.

Viðhalda skal styrkleikum prófunarefnisins í allt að 80% af upphafsstyrknum á tímabili sem samsvarar tímalengd prófunarinnar.

Vegna efna sem leysast auðveldlega upp í prófunarmiðlinum og gefa stöðugar lausnir, þ.e. þau sem gufa ekki upp svo marktækt sé, brotna ekki niður, vatnsrofna ekki né ásogast, má líta á upphafsstyrkinn sem jafngildan nafnstyrknum. Leggja skal fram gögn um að styrkleikunum hafi verið viðhaldið alla prófunina og að gæðaviðmiðanirnar hafi verið uppfylltar.

Fyrir efni sem:

i. eru torleysanleg í prófunarmiðlinum, eða

ii. geta myndað stöðugar ýrulausnir eða dreifilausnir, eða

iii. eru ekki stöðug í vatnslausnum,

skal líta á upphafsstyrkinn sem styrkinn sem mældur er við upphaf prófunarinnar. Ákvarða skal styrkinn eftir að jafnvægi hefur náðst.

Í öllum þessum tilvikum verður að gera frekari mælingar meðan á prófuninni stendur til að staðfesta raunstyrk váhrifanna eða að gæðaviðmiðanirnar hafi verið uppfylltar.

Þekkt er að umtalsverður hluti prófunarefnisins getur verið tekinn upp í þörungalífmassann meðan á prófuninni stendur. Til þess að sýna fram á að fyrrnefndar gæðaviðmiðanir séu uppfylltar skal því hafa hliðsjón bæði af því magni efnisins sem tekið er upp í þörungalífmassann og því sem er í lausninni (eða, ef það er ekki hægt tæknilega, mælt í vatnssúlunni). Þar sem ákvörðun á styrk efnisins í lífmassa þörunganna getur þó haft í för með sér umtalsverð tæknileg vandamál má sýna fram á að gæðaviðmiðanirnar sé uppfylltar með því að keyra prófunarílát með mesta styrk efnisins, en án þörunga, og mæla styrkleika í lausn (eða, ef það er ekki mögulegt, í vatnssúlunni) við upphaf og lok prófunartímabilsins.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Prófefni**

1.6.1.1. *Lausnir prófunarefna*

Stofnlausnir í nauðsynlegum styrk eru tilreiddar með því að leysa efnið upp í afjónuðu vatni eða vatni samkvæmt lið 1.6.1.2.

Valdir prófunarstyrkir eru tilreiddir með því að bæta viðeigandi deiliskömmtum út í þörungaforræktir (sjá 1. viðbæti).

Efni skal almennt aðeins prófa upp að leysnimörkum. Fyrir sum efni (t.d. efni með litla vatnsleysni, hátt P_{ow} eða þau sem mynda stöðuga dreifilausn frekar en eiginlega lausn í vatni) er viðunandi að keyra prófunarstyrk sem er yfir leysnimörkum efnisins til að tryggja að hámarksleysni/stöðugur styrkur hafi náðst. Hins vegar er mikilvægt að þessi styrkur trufli prófunarkerfið ekki á annan hátt (t.d. að efnið myndi lag á vatnsyfirborðinu sem hindrar súrefnismettun vatnsins, o.s.frv.).

Nota má úthljóðsdreifingu, lífræna leysa, ýruefni eða dreifiefni til að auðvelda tilreiðslu stofnlausna efna með litla vatnsleysni eða til að stuðla að dreifingu þessara efna í prófunarmiðlinum. Þegar slík hjálparefni eru notuð skulu allir prófunarstyrkir innihalda sama magn hjálparefnis og allur viðbótarsamanburður látinn verða fyrir váhrifum af sama styrk hjálparefnisins og notaður er í prófunarsyrpunni. Halda skal styrk slíkra hjálparefna í lágmarki, en þau skulu aldrei vera yfir 100 mg í lítra í prófunarmiðlinum.

Prófunina skal framkvæma án sýrustigsstillingar. Ef vísbendingar eru um greinilega breytingu á sýrustigi er mælt með að prófunin sé endurtekin með sýrustigsstillingu og greint frá niðurstöðunum. Í því tilviki skal sýrustigsstilla stofnlausnina til samræmis við sýrustigsgildi vatnsins í lausninni nema sérstakar ástæður séu fyrir að gera það ekki. Til þess eru HCl og NaOH æskilegust. Sýrustigsstillinguna skal gera þannig að ekki verði marktæk breyting á styrk prófunarefnisins í stofnlausninni. Greina skal frá því ef prófunarefnasambandið verður fyrir einhverjum efnahvörfum eða eðlisrænum útfellingum vegna stillingarinnar.

1.6.1.2. *Prófunarmiðill*

Vatnið skal vera eimað vatn af miklum gæðum eða afjónað vatn með eðlisleiðni minni en 5 $\mu S.cm_{-1}$. Í búnaðinum fyrir eimingu á vatni mega ekki vera neinir hlutar úr kopar.

Mælt er með eftirfarandi miðlum.

Fjórar stofnlausnir eru tilreiddar, í samræmi við eftirfarandi töflu. Stofnlausnirnar eru dauðhreinsaðar með himnusíun eða með gufusæfingu og geymdar í myrkri við 4 °C. Stofnlausn nr. 4 skal aðeins dauðhreinsa með himnusíun. Þessar stofnlausnir eru þynntar til að ná endanlegum næringarefnastyrk í prófunar-lausninni.

Næringarefni	Styrkur í stofnlausninni	Endanlegur styrkur í prófunarlausninni
Stofnlausn 1: helstu næringarefni		
NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l
$MgCl_2.6H_2O$	1,2 g/l	12mg/l
$CaCl_2.2H_2O$	1,8 g/l	18 mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	1,5 g/l	15 mg/l
KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
Stofnlausn nr. 2: Fe-EDTA		
$FeCl_3.6H_2O$	80 mg/l	0,08 mg/l
Na_2-EDTA.$2H_2O$	100 mg/l	0,1 mg/l
Stofnlausn 3: snefilefni		
H_3BO_3	185 mg/l	0.185 mg/l
$MnCl_2.4H_2O$	415 mg/l	0.415 mg/l
$ZnCl_2$	3 mg/l	3×10^{-3} mg/l
$CoCl_2.6H_2O$	1,5 mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$ mg/l
$CuCl_2.2H_2O$	0,01 mg/l	10^{-5} mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$	7 mg/l	7×10^{-3}mg/l
Stofnlausn nr. 4: $NaHCO_3$		
$NaHCO_3$	50 g/l	50 mg/l

pH-gildi miðilsins eftir jafnvægisstillingu með lofti er u.þ.b. 8.

1.6.2. **Búnaður**

— Venjulegur rannsóknarstofubúnaður.

— prófunarflöskur með hæfilegt rúmmál (t.d. eru 250 ml keiluflöskur hentugar þegar rúmmál prófunarlausnarinnar er 100 ml). Allar prófunarflöskur eiga að vera úr sama efni og af sömu stærð,

— ræktunarbúnaður: skápur eða klefi þar sem hægt er að halda hitastiginu á bilinu 21 °C til 25 °C ± 2 °C og hafa samfellda einsleita lýsingu á rófsviðinu 400 til 700 nm. Ef þörungar í samanburðarræktum hafa náð ráðlögðum vaxtarhraða má gera ráð fyrir að aðstæður fyrir vöxt, þ.m.t. ljósstyrkur, hafi verið fullnægjandi.

Við meðalgildi prófunarlausnanna er mælt með að nota ljósstyrk á bilinu 60 til 120 $\mu E.m.^{-2}.s^{-1}$ (35 til 70 × 10^{18} ljóseindir.$m^{-2}.s^{-1}$) þegar mælt er á sviðinu 400 til 700 nm með viðeigandi nema. Hæfilegt samsvarandi svið fyrir ljósmælitæki sem eru kvörðuð í lúxum er 6000 til 10 000 lúx.

Ljósstyrknum mætti ná með því að nota fjóra til sjö 30 W flúrpípu af „universal white“-gerðinni (litarhitastig u.þ.b. 4300 K), með 0,35 m fjarlægð frá þörungaræktinni,

— Gera skal mælingar á frumuþéttni með því að nota þá aðferð að telja lifandi frumur beint, t.d. í smásjá með talningarhólfum. Hins vegar má nota aðrar aðferðir (ljósmælingu, gruggmælingu, ...) ef þær hafa fullnægjandi næmi og sýnt er að samsvörun þeirra við frumuþéttnina sé fullnægjandi.

1.6.3. **Prófunarlífverur**

Lagt er til að þær tegundir grænþörunga sem notaðar eru séu tegundir sem vaxa hratt og eru hentugar í ræktun og til prófunar. Mælt er með eftirfarandi tegundum:

— *Selenastrum capricornutum*, t.d. ATCC 22662 eða CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus*, t.d. 86.81 SAG,

Athugasemd:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)
CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)
SAG = Collection of algal culture (Gottingen, F.R.G.)

Ef aðrar tegundir eru notaðar skal tilgreina stofn.

1.6.4. **Prófunaraðferð**

Niðurstöður skammtastærðaprófana eru notaðar til þess að ákvarða á hvaða styrkleikabili líklegt er að áhrif komi fram.

Vaxtarmælikvarðarnir tveir (lífmassi og vaxtarhraði) geta gefið afar mismunandi niðurstöður um vaxtarhömlun og nota skal þá báða í skammtastærðarprófuninni til þess að tryggt sé að með jafnhlutfallarunu styrkleikanna sé hægt að meta bæði E_bC_{50} og E_rC_{50}.

Upphafsþéttni frumna

Mælt er með að upphafsþéttni frumna í prófunarræktunum sé um 10^4 frumur/ml fyrir *Selenastrum capricornutum* og *Scenedesmus subspicatus*. Þegar aðrar tegundir eru notaðar skal lífmassinn vera sambærilegur.

Styrkleikar prófunarefnis

Fyrir prófunina eru gerðir minnst fimm styrkleikar í jafnhlutfallaröð með styrkhlutfall ekki hærra en 2,2. Minnsti styrkurinn sem prófaður er skal ekki hafa nein merkjanleg áhrif á vöxt þörunganna. Hæsti styrkurinn sem prófaður er skal hamla vexti um a.m.k. 50% miðað við samanburðarhópinn og helst stöðva vöxt fullkomlega.

Samhliða prófanir og samanburðarprófanir

Í tilhögun prófunarinnar skulu felast þrjár samhliða prófanir við hvern prófunarstyrk. Keyrðar eru þrjár samanburðarprófanir án prófunarefnis og ef við á eru einnig keyrðar þrjár samanburðarprófanir með hjálparefni. Ef ástæða er til má breyta tilhögun prófunar þannig að styrkleikastigum sé fjölgað og samhliða prófunum á hverju styrkleikastigi fækkað.

Framkvæmd prófunarinnar

Prófunarræktir sem innihalda tilætlaða styrkleika af prófunarefni og tilætlað magn af þörungasáði eru tilreiddar með því að bæta deiliskömmtum af stofnlausnum prófunarefnisins í hæfilegt magn af þörungaforræktum (sjá 1. viðbæti).

Ræktunarflöskurnar eru hristar og settar í ræktunarbúnaðinn. Þörungafrumunum er haldið í sviflausn með því að hrista hana, hræra eða með loftbólun til að bæta loftskipti og draga úr breytileika á sýrustigi í prófunarlausnunum. Viðhalda skal hitastigi í ræktunum á bilinu 21 til 25 °C, haldið innan ± 2 °C.

Frumuþéttnina í hverri flösku skal ákvarða a.m.k. á 24., 48. og 72. klukkustund eftir að prófunin hefst. Ef notaðar eru aðrar aðferðir en bein talning til að mæla frumuþéttleika er notaður síaður þörungamiðill, sem inniheldur viðeigandi styrk af prófunaríðefninu, til að ákvarða bakgrunninn.

Sýrustigið er mælt við upphaf prófunarinnar og eftir 72 klukkustundir.

Frávik á sýrustigi í samanburðarprófununum skal almennt ekki vera meira en sem nemur 1,5 einingum meðan á prófuninni stendur.

Prófun rokgjarnra efna

Að svo stöddu er ekki til nein almennt viðurkennd aðferð til að prófa rokgjörn efni. Hægt er að nota lokaðar prófunarflöskur með auknu kollrúmi ef vitað er að efni hafi tilhneigingu til að gufa upp. Hafa skal í huga möguleikann á skorti á CO_2 þegar kollrúmið í lokuðu flöskunum er reiknað út. Tillögur um breytingar á þessari aðferð hafa verið settar fram (sjá 4. heimild).

Reynt skal að ákvarða það magn efnis sem eftir verður í lausn og mælt er með sérstakri varúð við túlkun á niðurstöðum prófana með rokgjörnum íðefnum í lokuðum kerfum.

Markprófun

Með þeim verkferlum sem lýst er í þessari aðferð má gera markprófun með 100 mg á lítra til að sýna fram á að EC_{50} sé hærri en sá styrkur.

Ef eðli íðefnisins er þannig að ekki er hægt að ná styrk sem nemur 100 mg/l í prófunarvatninu skal framkvæma markprófunina með styrk sem jafngildir leysni efnisins (eða þeim hámarksstyrk sem myndar stöðuga dreifilausn) í miðlinum sem notaður er (sjá einnig lið 1.6.1.1).

Markprófunina skal framkvæma minnst þrefalda, með sama fjölda samanburðarhópa. Nota skal vaxtar-mælikvarðana tvo (lífmassa og vaxtarhraða fyrir markprófunina.

Ef fram kemur meðaltalsminnkun, 25% eða meira, á annað hvort lífmassa eða vaxtarhraða milli markprófunarinnar og samanburðarprófunarinnar skal framkvæma heildarprófun.

2. **GÖGN OG MAT**

Mældur frumuþéttleiki í prófunarræktum og samanburðarræktum er settur upp í töflu ásamt styrkjum prófunarefnisins og mælingatímunum. Meðalgildi frumuþéttninnar fyrir hvern styrk prófunarefnisins og fyrir samanburðarræktirnar er teiknað á móti tíma (0–72 klst.) til að fá vaxtarferla.

Til að ákvarða venslin milli styrks og áhrifa skal nota eftirfarandi tvær nálganir. Sum efni geta örvað vöxtinn í lágum styrk. Aðeins skal taka til greina gagnapunkta sem benda til hömlunar milli 0 og 100%.

2.1. SAMANBURÐUR Á SVÆÐUM UNDIR VAXTARFERLUNUM

Svæðið milli vaxtarferlanna og láréttu línunnar $N = N_0$ má reikna út samkvæmt formúlunni:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \ldots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

þar sem:

A = svæði

N_o = fjöldi frumna/ml á tíma t_0 (upphaf prófunarinnar), $_o$,

N_1 = mældur fjöldi frumna/ml á t_1

N_n = mældur fjöldi frumna/ml á tíma

t_1 = tími fyrstu mælingar eftir upphaf prófunar

t_n = tími n-tu mælingar eftir upphaf prófunar

n = fjöldi mælinga sem teknar eru eftir upphaf prófunarinnar.

Hundraðshluti hömlunar á frumuvexti við hvern styrk prófunarefnis (I_A) er reiknaður samkvæmt formúlunni:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

þar sem:

A_c = svæðið milli vaxtarferils samanburðarins og láréttu línunnar $N = N_o$.

A_t = svæðið milli vaxtarferilsins við styrk t og láréttu línunnar $N = N_o$.

I_A = gildi eru teiknuð á hálflograpappír, eða á hálflograðan probit-pappír, á móti samsvarandi styrkleikum. Ef teiknað er á probit-pappír eru punktarnir aðlagaðir beinni línu, annaðhvort eftir auganu eða með reiknuðu aðhvarfi.

EC_{50} er áætlað út frá aðhvarfslínunni með því að finna styrkinn sem jafngildir 50% hömlun (I_A = 50%). Lagt er til að nota E_bC_{50} sem ótvírætt tákn fyrir þetta gildi í þessari reikniaðferð. Nauðsynlegt er að E_bC_{50} sé gefið upp með viðeigandi váhrifatímabili, t.d. E_bC_{50} (0–72 klst.).

2.2. SAMANBURÐUR Á VAXTARHRÖÐUM

Sértækan meðalvaxtarhraða (μ) fyrir ræktir í veldisvexti er hægt að reikna sem

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

þar sem t_o er tíminn við upphaf prófunarinnar.

Sértækan meðalvaxtarhraða má einnig leiða út frá hallatölu aðhvarfslínunnar við feril fyrir ln N á móti tíma.

Hundraðshluti hömlunar á sértækum vaxtarhraða við hvern styrkleika prófunarefnis ($I_{\mu t}$) er reiknaður samkvæmt formúlunni:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

þar sem:

μc = sértækur meðalvaxtarhraði samanburðar

μt = sértækur meðalvaxtarhraði fyrir prófunarstyrk t

Minnkun, í hundraðshlutum, á sértækum meðalvaxtarhraða við hvern styrkleika prófunarefnis í samanburði við samanburðargildið er teiknuð á móti logranum af styrknum. Grafið sem fæst sýnir EC_{50}-gildið. Lagt er til að notað sé E_rC_{50} sem ótvírætt tákn fyrir EC_{50}-gildið sem fengið er með þessari aðferð. Tilgreina þarf mælingatíma, t.d. verður táknið „E_rC_{50} (0–72 klst.)“ ef gildið tengist tímasetningunum 0 og 72 klst.

Athugasemd: hugtakið „sértækur vaxtarhraði“ felur í sér logrun og litlar breytingar á vaxtarhraða geta leitt til mikilla breytinga á lífmassa. Því eru E_bC- og E_rC-gildi ekki tölulega sambærileg.

2.3. ÚTREIKNINGUR Á STYRK SEM HEFUR ENGIN MERKJANLEG ÁHRIF (NOEC)

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif er ákvarðaður með tölfræðiaðferð sem hentar fyrir fjölsýna samanburð (t.d. með dreifnigreiningu og Dunnett-prófun) út frá einstökum gildum úr samhliða prófunum fyrir svæðið undir vaxtaferlunum A (sjá lið 2.1) eða út frá sértæka vaxtarhraðanum μ (sjá lið 2.2).

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— prófunarefni: efnafræðileg sanngreiningargögn,

— prófunarlífverur: uppruni, rannsóknarstofurækt, númer stofns, ræktunaraðferð,

— Prófunarskilyrði:

  — dagsetning upphafs og loka prófunarinnar og hve lengi hún stendur,

  — hitastig,

  — samsetning miðils,

  — ræktunarbúnaður,

  — sýrustig lausna við upphaf og lok prófunarinnar (útskýringar skulu gefnar ef í ljós koma pH-frávik sem eru meiri en 1,5 eining),

  — burðarefni og aðferð sem notuð er við að leysa upp prófunarefnið og styrkur burðarefnisins í prófunarlausnunum,

  — ljósstyrkur og gæði,

  — styrkir sem eru prófaðir (mældir eða nafnstyrkir).

— Niðurstöður:

  — frumuþéttni í hverri flösku við hvern mælipunkt og aðferð við mælingar á frumuþéttni,

— meðalgildi frumuþéttni,

— vaxtarferlar,

— myndræn útfærsla á sambandi styrks og áhrifa,

— EC gildi og reikniaðferð,

— styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif,

— önnur áhrif sem koma í ljós.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.

2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge Scenedesmus subspicatus", in: Rudolph/Boje: bkotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

3) ISO 8692 — Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum.

4) S.Galassi and M.Vighi — Chemosphere, 1981, vol.10, 1123-1126.

1. viðbætir

Dæmi um tilhögun við ræktun þörunga

Almennar athugasemdir

Tilgangurinn með ræktun á grundvelli eftirfarandi tilhögunar er að fá þörungaræktir fyrir eiturhrifaprófanir.

Nota skal viðeigandi aðferðir til að tryggja að þörungaræktirnar séu ekki sýktar af bakteríum (ISO 4833). Hreinræktir geta verið æskilegar en einþörungsræktir eru nauðsynlegar.

Allar aðgerðir skulu fara fram við dauðhreinsaðar aðstæður til að koma í veg fyrir mengun af völdum baktería eða annarra þörunga. Hafna skal menguðum ræktum.

Tilhögun við að fá fram þörungaræktir

Tilreiðsla næringarlausna (æti):

ætið má tilreiða með því að þynna óblandaðar stofnlausnir næringarefna. Til að fá æti í föstu formi er bætt við 0,8% af agar. Ætið sem er notað skal vera dauðhreinsað. Dauðhreinsun með gufusæfingu getur leitt til taps á NH_3.

Stofnrækt

Stofnræktirnar eru litlar þörungaræktir sem eru færðar reglubundið yfir í nýtt æti og nýttar sem upphafsprófunarefni. Ef ræktirnar eru ekki notaðar reglubundið er þeim strokið á agaræti í hallandi tilraunaglösum. Ræktirnar eru þá fluttar í nýtt æti eigi sjaldnar en annan hvern mánuð.

Stofnræktirnar eru ræktaðar í keiluflöskum með viðeigandi æti (magn u.þ.b. 100 ml). Ef þörungarnir eru ræktaðir við 20 °C í stöðugri lýsingu er nauðsynlegt að flytja þá vikulega.

Við flutning í nýtt æti er ákveðið magn af „gömlu“ ræktinni flutt í flösku með nýju æti með dauðhreinsuðum pípettum þannig að upphafleg þéttni tegunda sem vaxa hratt er u.þ.b. 1/100 af því sem er í gömlu ræktinni.

Vaxtarhraða tegundar má ákvarða út frá vaxtarferlinum. Ef hann er þekktur er hægt að áætla hversu þétt ræktin má verða áður en hún er flutt í nýtt æti. Þetta verður að gera áður en ræktin nær dauðafasa.

Forrækt:

Forræktin hefur þann tilgang að fá fram hæfilegt magn þörunga til sáningar í prófunarræktir. Forræktin er ræktuð við prófunarskilyrðin og notuð meðan hún er enn í veldisvexti, yfirleitt eftir um þriggja daga ræktunartíma. Ef þörungaræktir innihalda vanskapaðar eða afbrigðilegar frumur verður að fleygja þeim.

2. viðbætir

Í ISO 8692 — „Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*“ er greint frá eftirfarandi niðurstöðum fyrir fjölsetra prófun á 16 rannsóknarstofum þar sem kalíumdíkrómat var prófað:

	Meðaltal (mg/l)	Styrkbil (mg/l)
E_rC_{50} (0–72 klst).	0,84	0,60 til 1,03
E_bC_{50} (0–72 klst).	0,53	0,20 til 0,75

C.4. ÁKVÖRÐUN Á AUÐLÍFBRJÓTANLEIKA

I. HLUTI ALMENN ATRIÐI

I.1. INNGANGUR

Lýst er sex prófunaraðferðum sem gera kleift að skima fyrir auðlífbrjótanleika íðefna í loftháðum vatnskenndum miðli:

a) Niðurbrot á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (Aðferð C.4-A)

b) Breytt OECD-skimunarprófun — Niðurbrot á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC-niðurbrot) (Aðferð C.4-B)

c) Koltvísýringútlosun (CO_2) (breytt Sturm-prófun) (Aðferð C.4-C)

d) Öndunarprófun með þrýstimælingu (Aðferð C.4-D)

e) Lokuð flaska (Aðferð C.4-E)

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry (Ráðuneyti alþjóðaviðskipta og iðnaðar) — Japan)) (Aðferð C.4-F)

Almennar og algengar athugasemdir við allar sex prófanirnar eru settar fram í I. hluta aðferðarinnar. Þættir sem eru sértækir fyrir einstakar aðferðir eru settir fram í II. til VII. hluta. Í viðbætum eru skilgreiningar, formúlur og leiðbeinandi efni.

Fjölsetra OECD-samanburðarprófun, gerð 1988, hefur sýnt að samræmi er milli niðurstaðna fengnum með aðferðunum. Það fer hins vegar eftir eðliseiginleikum efnisins sem skal prófa hvort ein aðferðanna hentar betur en önnur.

I.2. VAL Á VIÐEIGANDI PRÓFUNARAÐFERÐ

Til að velja aðferðina sem á best við eru upplýsingar um leysni íðefnisins, gufuþrýsting þess og ásogseiginleika nauðsynlegar. Efnabyggingin eða formúla þarf að vera þekkt til að hægt sé að reikna út fræðileg gildi og/eða til að hafa eftirlit með mæligildi mæliþátta, t.d. fræðilegri súrefnisþörf (ThOD), fræðilega reiknuðum koltvísýringi ($ThOC_2$), uppleystu, lífrænu kolefni (DOC), heildarmagni lífræns kolefnis (TOC) og efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) (sjá 1. og 2. viðbæti).

Prófunaríðefni með leysni í vatni upp að minnst 100 mg/l er hægt að meta með öllum aðferðunum, að því tilskildu að þau séu órokgjörn og ásogist ekki. Viðeigandi aðferðir eru gefnar upp í töflu 1 fyrir þau íðefni sem eru torleysanleg í vatni, eru rokgjörn eða ásogast. Verkháttum vegna íðefna sem eru torleyst í vatni og rokgjarnra íðefna er lýst í 3. viðbæti. Hægt er að gera prófun á niðurbroti á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í miðlungi rokgjörnum íðefnum ef fullnægjandi gasrými er í prófunarílátunum (sem skal vera með viðeigandi tappa). Í því tilviki þarf að setja upp samanburð án lífvera fyrir hvers kyns efnislegt tap.

Tafla 1:

Notkunarsvið prófunaraðferða

Prófun	Greiningaraðferð	Hæfi fyrir efni sem eru:		
		torleysanleg	rokgjörn	ásogast
DOC-niðurbrot	Uppleyst, lífrænt kolefni	–	–	+/–
Breytt OECD, niðurbrot	Uppleyst, lífrænt kolefni	–	–	+/–
CO_2-útlosun	Öndunarprófun: CO_2-útlosun	+	–	+
Öndunarprófun með þrýstimælingu	Öndunarprófun með þrýstimælingu: súrefnisupptaka	+	+/–	+

Prófun	Greiningaraðferð	Hæfi fyrir efni sem eru:		
		torleysanleg	rokgjörn	ásogast
Lokuð flaska	Öndunarprófun: uppleyst súrefni	+/–	+	+
MITI	Öndunarprófun: súrefnisupptaka	+	+/–	+

Upplýsingar um hreinleika eða innbyrðis hlutföll aðalefnisþátta prófunarefnisins eru nauðsynlegar við túlkun á niðurstöðunum sem fást, sérstaklega þegar niðurstöðurnar eru lágar eða nærri mörkum.

Upplýsingar um eiturhrif prófunaríðefnisins á bakteríur (sjá 4. viðbæti) er hægt að nota til að velja viðeigandi prófunarstyrki og geta skipt sköpum fyrir rétta túlkun á lágum gildum fyrir lífniðurbrot.

I.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Til að fylgjast með aðferðinni er gerð prófun á viðmiðunaríðefnum, sem uppfylla skilyrðin um auðlífbrjótanleika, með því að setja upp viðeigandi flösku samhliða venjulegu prófununum.

Viðeigandi íðefni eru anilín (nýeimað), natríumasetat og natríumbensóat. Þessi viðmiðunaríðefni brotna öll niður í þessum prófunum, jafnvel þegar engu sáði er vísvitandi bætt í.

Lagt var til að leitað yrði að viðmiðunaríðefni sem væri auðlífbrjótanlegt en þyrfti sáð til viðbótar. Stungið hefur verið upp á kalíumvetnisþalati en nauðsynlegt er að afla frekari gagna með þessu efni áður en hægt er að viðurkenna það sem viðmiðunarefni.

Í öndunarprófunum geta efnasambönd sem innihalda köfnunarefni haft áhrif á súrefnisupptöku vegna nítrunar (sjá 2. og 5. viðbæti).

I.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐANNA

Sáð er í lausn, eða sviflausn, af prófunarefninu í steinefnamiðli og hún ræktuð við loftháðar aðstæður í myrkri eða við dreifð birtuskilyrði. Halda skal magni uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) í prófunar-lausninni af völdum sáningarinnar eins lágu og mögulegt er í samanburði við magnið af uppleystu, lífrænu kolefni af völdum prófunarefnisins. Tekið er tillit til innrænnar virkni sáðsins með því að keyra samhliða blankprófun með sáði en án prófunarefnis en þó verður innræn virkni frumnanna í snertingu við efnið ekki nákvæmlega sú sama og í innræna samanburðinum. Keyrð er prófun með viðmiðunarefni samhliða til að fylgjast hvernig tilhögunin gengur.

Að jafnaði er fylgst með niðurbrotinu með því að ákvarða mæliþætti eins og uppleyst, lífrænt kolefni (DOC), koltvísýringsframleiðslu og súrefnisupptöku og mælingar eru gerðar með nægilega stuttu millibili til að hægt sé að greina byrjun og lok lífniðurbrots. Með sjálfvirkum öndunarmælum er mælingin samfelld. Uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) er stundum mælt til viðbótar við annan mæliþátt en það er venjulega aðeins gert við upphaf og lok prófunarinnar. Einnig er hægt að nota sértæka efnagreiningu til að meta frumniðurbrot prófunarefnisins og til að ákvarða styrk allra milliefna sem myndast (skyldubundið í MITI-prófuninni).

Prófunin stendur venjulega í 28 daga. Prófunum má hins vegar ljúka áður en 28 dagar eru liðnir, þ.e. um leið og a.m.k. þrjár ákvarðanir sýna að lífniðurbrotsferillinn hefur náð jafnvægi. Prófanir má einnig lengja fram yfir 28 daga ef ferillinn sýnir að lífniðurbrot er hafið en hefur ekki náð jafnvægi á 28. degi.

I.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

I.5.1. **Samanburðarnákvæmni**

Vegna eðlis lífniðurbrots og af því að bakteríuþýðin, sem eru notuð, eru blanda skal hver greining a.m.k. tvítekin.

Almennt er reynslan sú að breytileikinn milli samhliða prófana minnkar eftir því sem þéttni örveranna, sem er bætt í prófunarmiðilinn í upphafi, er meiri. Hringprófanir hafa einnig sýnt að breytileiki getur verið mikill milli niðurstaðna frá mismunandi rannsóknarstofum en gott samræmi hefur venjulega fengist með auðlífbrjótanlegum efnasamböndum.

I.5.2. **Gildi prófunarinnar**

Prófun er talin gild ef ekki munar meira en 20% á ítrustu gildum fyrir fjarlægingu prófunaríðefnisins við jafnvægi í samhliða prófunum (e. *extremes of replicate values*) í lok prófunarinnar, eða við lok 10 daga gluggans eftir því sem við á, og ef hundraðshluti niðurbrots viðmiðunarefnisins hefur náð gildinu fyrir auðlífbrjótanleika eftir 14 daga. Sé annað hvort þessara skilyrða ekki uppfyllt skal endurtaka prófunina. Þar sem skilyrði aðferðanna eru ósveigjanleg þýða lág gildi ekki endilega að prófunarefnið sé ekki lífbrjótanlegt við umhverfisaðstæður heldur gefa þau til kynna að frekari athuganir séu nauðsynlegar til að ákvarða lífbrjótanleika.

Ef niðurbrot í eiturhrifaprófun, sem inniheldur bæði prófunarefni og viðmiðunaríðefni, verður minna en 35% (byggt á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)) eða minna en 25% (byggt á fræðilegri súrefnisþörf (ThOD) eða fræðilegum koltvísýringi ($ThCO_2$)) á 14 dögum má gera ráð fyrir að prófunaríðefnin séu hamlandi (sjá einnig 4. viðbæti). Prófunarsyrpurnar skal endurtaka með minni styrk prófunaríðefnis og/eða meiri þéttni sáðs, ef mögulegt er, en ekki með meira en 30 mg af föstum efnum í lítra.

I.6. ALMENNT VERKFERLI OG UNDIRBÚNINGUR

Almenn skilyrði sem eiga við prófanirnar eru tekin saman í töflu 2. Búnaði, og öðrum skilyrðum í tilraunum sem eiga sérstaklega við hverja einstaka prófun, er lýst síðar undir fyrirsögninni fyrir þá prófun.

Tafla 2

Prófunarskilyrði

Prófun	DOC-niðurbrot	CO_2-útlosun	Öndunar-prófun með þrýsti-mælingu	Breytt OECD-skimunar-prófun	Lokuð flaska	MITI (I)
Styrkur prófunar-efnis						
sem mg/l			100		2–10	100
mg DOC/1	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/1			50–100		5–10	
Þéttni sáðs (í frumum/l, nokkurn veginn)	≤ 30 mg/l SS eða ≤ 100 ml frárennsli/l (10^7–10^8)			0,5 ml annars stigs frárennsli/1 (10^5)	≤ 5 ml af frárennsli/l (10^4–10^6)	30 mg/l SS (10^7–10^8)
Styrkur frumefna í steinefn-amiðli (í mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05–0,1				0,05–0,1	0,15
pH-gildi	7,4 ± 0,2					helst 7,0

Prófun	DOC-niðurbrot	CO_2-útlosun	Öndunar-prófun með þrýsti-mælingu	Breytt OECD-skimunar-prófun	Lokuð flaska	MITI (I)
Hitastig	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = Uppleyst lífrænt kolefni		ThOD = Fræðileg súrefnisþörf				SS = Svifefni

I.6.1. **Þynningarvatn**

Notað er afjónað eða eimað vatn, laust við eiturefni í hamlandi styrk efna (t.d. Cu ++ jóna). Það má ekki innihalda meira en 10% af því lífræna kolefni sem kemur með prófunarefninu. Mikill hreinleiki prófunarvatnsins er nauðsynlegur til að koma í veg fyrir há blankgildi. Mengun getur stafað af eðlislægum óhreinindum og einnig frá jónaskiptaresíni og rofefnum frá bakteríum og þörungum. Aðeins skal nota eina lotu af vatni fyrir hverja prófunarröð og hana þarf að yfirfara fyrirfram með greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC). Slíkt eftirlit er ekki nauðsynlegt vegna prófunarinnar í lokaðri flösku en súrefnisupptaka vatnsins verður að vera lítil.

I.6.2. **Stofnlausnir úr steinefnaþáttum**

Fyrir blöndun prófunarlausna eru gerðar stofnlausnir með viðeigandi styrk steinefnaþátta. Eftirfarandi stofnlausnir má nota (með mismunandi þynningarstuðlum) fyrir eftirtaldar aðferðir: niðurbrot á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC), breytta OECD-skimunarprófun, koltvísýringsútlosun, öndunarprófun með þrýstimælingu og prófun í lokaðri flösku.

Þynningarstuðlarnir, og fyrir MITI prófunina einnig sértæk tilreiðslan á steinefnamiðlinum, koma fram undir fyrirsögninni fyrir hverja prófun.

Stofnlausnir

Tilreiðið eftirfarandi stofnlausnir með prófefni af greiningarhreinleika.

a) mónókalíumdíhýdrógenortófosfat, KH_2PO_4 8,50 g

díkalíummónóhýdrógenortófosfat, K_2HPO_4 21,75 g

dínatríummónóhýdrógenortófosfatdíhýdrat, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$ 33,40 g

ammóníumklóríð, NH_4Cl 0,50 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra. pH-gildi lausnarinnar skal vera 7,4.

b) kalsíumklóríð, vatnsfrítt, $CaCl_2$ 27,50g

eða kalsíumklóríðdíhýdrat, $CaCl_2 . 2 H_2O$ 36,40 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

c) magnesíumsúlfatheptahýdrat, MgSO4 . 7 H_2O 22,50 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

d) járn(III)klóríðhexahýdrat, $FeCl_3 . 6H_2O$ 0,25 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

Athugasemd: til að komast hjá því að þurfa að tilreiða þessa lausn rétt fyrir notkun má bæta einum dropa af óblönduðu HCl eða 0,4 g af etýlendíamíntetraediksýrudínatríumsalti (EDTA) í hvern lítra.

I.6.3. **Stofnlausnir af íðefnum**

Ef leysnin er meiri en 1 g/l eru t.d. leyst 1–10 g, eftir því sem við á, af prófunar- eða viðmiðunaríðefni í afjónuðu vatni og fyllt upp að 1 lítra. Annars má tilreiða stofnlausnir í steinefnamiðlinum eða bæta íðefninu beint í steinefnamiðilinn. Sjá 3. viðbæti vegna meðhöndlunar á íðefnum með minni leysni en í MITI prófuninni (Aðferð C.4-F) eru hvorki notaðir leysar né ýruefni.

I.6.4. **Sáð**

Sáðið má koma úr ýmsum uppsprettum: virkri seyru, skólpfrárennsli (óklóruðu), yfirborðsvatni og jarðvegi eða úr blöndu af þessu. Ef virk seyra er notuð fyrir prófanir á niðurbroti á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) og koltvísýringsútlosun og öndunarprófun með þrýstimælingu skal taka hana úr hreinsistöð eða rannsóknarstofueiningu sem tekur aðallega við heimilisskólpi. Komið hefur í ljós að sáð úr öðrum uppsprettum veitir dreifðari niðurstöður. Fyrir breytta OECD-skimunarprófun og prófunina í lokaðri flösku þarf sáð án seyruhnats sem er meira þynnt og er æskilegast að uppspretta þess sé annars stigs frárennsli frá skólphreinsistöð fyrir heimilisskólp eða rannsóknarstofueiningu. Sáðið fyrir MITI-prófunina er fengið úr ýmsum uppsprettum og er lýst í kaflanum fyrir þessa tilteknu prófun.

I.6.4.1. Sáð úr virkri seyru

Tekið er sýni af virkri seyru, nýrri, úr loftunarþró skólphreinsistöðvar eða rannsóknarstofueiningu sem meðhöndlar aðallega heimilisskólp. Ef nauðsyn krefur skal fjarlægja grófar agnir með síun gegnum fínt sigti og halda skal seyrunni loftháðri þar til hún er notuð.

Að öðrum kosti skal láta seyruna setjast eða skilja í hana skilvindu (t.d. við 100 g í 10 mínútur) eftir að allar grófar agnir hafa verið fjarlægðar. Flotinu skal fleygt. Seyruna má þvo í steinefnamiðlinum. Óblönduð seyra er leyst upp í steinefnamiðlinum til að gefa styrk sem nemur 3–5 g af svifögnum/l og loftblönduð þar til þarf að nota hana.

Taka skal seyru úr hefðbundinni stöð sem starfar á tilhlýðilegan hátt. Ef taka þarf seyru úr háhraða-hreinsistöðvum, eða ef talið er að hún innihaldi lata, skal þvo hana. Látið enduruppleysta seyruna setjast eða skiljið hana í skilvindu eftir rækilega blöndun, fleygið flotinu og leysið þvegnu seyruna upp aftur í nýjum steinefnamiðli. Endurtakið þetta ferli þar til talið er að seyran sé laus við umframmagn næringarefna eða lata.

Eftir að fullkomin enduruppleysing hefur náðst, eða ef um er að ræða ómeðhöndlaða seyru, skal taka sýni rétt fyrir notkun til að ákvarða þurrvigt svifagnanna.

Annar kostur er að gera virka seyru einsleita (3–5 g svifagnir/l). Meðhöndlið seyruna í vélrænum blandara í tvær mínútur á meðalhraða. Látið blönduðu seyruna setjast í 30 mínútur, eða lengur ef þörf krefur, og umhellið vökva til að nota sem sáð í magni sem nemur u.þ.b. 10 mg/l af steinefnamiðli.

I.6.4.2. Aðrar uppsprettur sáðs

Það má fá úr annars stigs frárennsli frá hreinsistöð eða rannsóknarstofueiningu sem tekur aðallega við heimilisskólpi. Takið nýtt sýni og geymið við loftháðar aðstæður meðan á flutningi stendur. Látið það setjast í 1 klst. eða síið í gegnum grófan síupappír og geymið flotið eða síuðu lausnina þar til þarf að nota hana. Nota má allt að 100 ml af þessari gerð sáðs í hvern lítra af miðli.

Önnur uppspretta fyrir sáð er yfirborðsvatn. Í því tilviki skal taka sýni af hentugu yfirborðsvatni, t.d. úr á eða vatni, og geyma við loftháðar aðstæður þar til þarf að nota það. Þykkið sáðið með síun eða skiljun ef nauðsyn krefur.

I.6.5. **Formeðhöndlun sáðs**

Heimilt er að formeðhöndla sáð með tilliti til tilraunaskilyrðanna en ekki að foraðlaga það að prófunaríðefninu. Formeðhöndlun felst í því að loftblanda virka seyru í steinefnamiðli eða annars stigs frárennsli í fimm til sjö daga við prófunarhitastigið. Formeðhöndlun eykur stundum nákvæmni prófunaraðferðanna með því að fækka blankgildum. Talið er ónauðsynlegt að formeðhöndla MITI sáð.

I.6.6. **Samanburður án lífvera**

Athugið hugsanlegt niðurbrot prófunarefnisins án tilstillis lífvera, ef þörf krefur, með því að ákvarða fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis (DOC), súrefnisupptöku eða koltvísýringsútlosun í dauðhreinsuðum samanburði án sáðs. Dauðhreinsið með síun í gegnum himnu (0,2–0,45 míkrómetra) eða með því að bæta við viðeigandi eiturefni í hæfilegum styrk. Ef himnusíun er notuð skal sýni tekið að viðhafðri smitgát til að viðhalda dauðhreinsun. Svo fremi að ásog prófunaríðefnisins hafi ekki verið útilokað fyrir fram verða prófanir sem mæla lífniðurbrot með fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis (DOC), einkum með sáði úr virkri seyru, að vera með samanburð, án lífvera, sem er sáð í og hann svo eitraður.

I.6.7. **Fjöldi flaskna**

Fjölda flaskna í dæmigerðri prófun er lýst undir fyrirsögnunum fyrir hverja einstaka prófun.

Nota má eftirfarandi flöskugerðir:

— prófunarsviflausn: inniheldur prófunarefni og sáð

— sáðblankur: inniheldur aðeins sáð

— verkferlissamanburður: inniheldur viðmiðunarefni og sáð

— dauðhreinsaður samanburður án lífvera: inniheldur prófunarefni (sjá lið 1.6.6)

— ásogssamanburður: inniheldur prófunarefni, sáð og dauðhreinsunarefni

— eiturhrifasamanburður: inniheldur prófunarefni, viðmiðunarefni og sáð

Ófrávíkjanlegt er að ákvarðanir séu gerðar samhliða í prófunarsviflausn og sáðblanki. Mælt er með að ákvarðanirnar séu einnig gerðar samhliða í hinum flöskunum.

Það er þó hugsanlega ekki alltaf mögulegt. Tryggt skal að fjöldi sýna eða mælinga nægi til að hægt sé að meta fjarlæginguna í hundraðshlutum í 10 daga glugganum.

I.7. GÖGN OG MAT

Við útreikning á D_t, hundraðshluta niðurbrotsins, er notað meðalgildi tvíteknu mælinganna á mæliþættinum í bæði prófunarílátunum og sáðblankinum. Formúlurnar eru settar fram í liðunum hér fyrir neðan um tilteknar prófanir. Ferli niðurbrotsins er sýnt myndrænt og 10 daga glugginn tilgreindur. Reiknaður er og skráður hundraðshluti fjarlægingar við lok 10 daga gluggans, sem og við jafnvægisgildið eða í lok prófunarinnar, eftir því sem við á.

Í öndunarprófunum geta efnasambönd sem innihalda köfnunarefni haft áhrif á súrefnisupptöku vegna nítrunar (sjá 2. og 5. viðbæti).

I.7.1. **Niðurbrot mælt með því að nota ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)**

Hundraðshluti niðurbrotsins á hverjum tíma sem sýni var tekið, D_t, skal reiknaður fyrir hverja flösku með prófunarefninu með því að nota meðalgildin fyrir tvíteknu mælingarnar á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) svo að hægt sé að meta gildi prófunarinnar. Hann er reiknaður með eftirfarandi formúlu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

þar sem:

D_t = % niðurbrot á tíma t

C_o = meðalupphafsstyrkur uppleysts, lífræns kolefnis í ísáða ræktunarmiðlinum sem inniheldur prófunarefnið (mg DOC/l)

C_t = meðalstyrkur uppleysts, lífræns kolefnis í ísáða ræktunarmiðlinum sem inniheldur prófunarefnið, á tíma t (mg DOC/l)

C_{bo} = meðalupphafsstyrkur uppleysts, lífræns kolefnis í ísáðum blanksteinefnamiðli (mg DOC/l)

C_{bt} = meðalstyrkur uppleysts, lífræns kolefnis í ísáðum blanksteinefnamiðli á tíma t (mg DOC/l)

Allir styrkir eru mældir með tilraunum.

I.7.2. **Niðurbrot mælt með því að nota sértæka greiningu**

Þegar tilgreind greiningargögn eru tiltæk skal reikna frumlífniðurbrot með:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

þar sem:

D_t = niðurbrot á tíma t, venjulega 28 dagar,
S_a = leifar af prófunarefni í ísáðum miðli við lok prófunar (mg),
S_b = leifar af prófunarefni í blankprófuninni með vatni/miðli sem aðeins prófunarefninu var bætt í (mg).

1.7.3. **Niðurbrot án tilstillis lífvera**

Þegar notaður er dauðhreinsaður samanburður án lífvera skal reikna hundraðshluta niðurbrots án tilstillis lífvera með:

$$\% \text{ niðurbrot án tilstillis lífvera} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

þar sem:

$C_{s(o)}$ = DOC-styrkur í dauðhreinsuðum samanburði á degi 0
$C_{s(t)}$ = DOC-styrkur í dauðhreinsuðum samanburði á degi t

I.8. SKÝRSLUGJÖF

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— prófunar- og viðmiðunaríðefni og hreinleiki þeirra,

— prófunarskilyrði,

— sáð: eiginleikar og sýnatökustaður eða -staðir, styrkur og hvers kyns meðferð,

— hlutfall og eiginleikar iðnaðarskólps í skólpi, ef þekkt,

— lengd prófunar og hitastig,

— meðferð, ef um er að ræða torleysanleg prófunaríðefni,

— prófunaraðferð sem beitt er; vísindalegar ástæður og útskýringar skulu gefnar á öllum breytingum frá verkferli,

— gagnablað,

— öll hömlunarfyrirbæri sem koma fram,

— allt niðurbrot án tilstillis lífvera sem kemur fram,

— gögn úr sértækri efnagreiningu, ef fyrirliggjandi,

— greiningargögn fyrir milliefni, ef fyrirliggjandi,

— línurit fyrir hundraðshluta niðurbrots á móti tíma fyrir prófunar- og viðmiðunarefnin og tilgreina skal með skýrum hætti upphafsfasa, niðurbrotsfasa, 10 daga glugga og halla (1. viðbætir). Ef prófunin hefur uppfyllt gildisskilyrðin, má nota í línuritið meðaltalið af hundraðshlutum niðurbrots í flöskunum sem innihalda prófunarefnið,

— hundraðshluti fjarlægingar eftir 10 daga gluggann og við jafnvægi eða í lok prófunarinnar.

II. HLUTI **PRÓFUN Á NIÐURBROTI Á UPPLEYSTU, LÍFRÆNU KOLEFNI (DOC)** (Aðferð C.4-A)

II.1. GRUNDVÖLLUR AÐFERÐARINNAR

Mælt rúmmál af ísáðum steinefnamiðli sem inniheldur þekktan styrk af prófunarefninu (10–40 mg uppleyst, lífrænt kolefni/l), sem nafngildi og einu uppsprettu lífræns kolefnis, er loftblandað í myrkri eða dreifðu ljósi við 22 ± 2 °C.

Fylgst er með niðurbroti með tíðri greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) á 28 daga tímabili. Umfang lífniðurbrots er reiknað út með því að setja fram styrkinn af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) sem er fjarlægt (leiðrétt fyrir því í blanksamanburðinum með sáðinu) sem hundraðshluta af upphafsstyrknum. Umfang frumlífniðurbrots má einnig reikna út frá viðbótarefnagreiningu við upphaf og lok ræktunar.

II.2. LÝSING Á AÐFERÐINNI

II.2.1. **Búnaður**

a) Keiluflöskur, t.d. 250 ml til tveggja lítra, eftir rúmmálinu sem þarf fyrir greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC).

b) hristari sem tekur keiluflöskurnar, annað hvort með sjálfvirkri hitastýringu eða sem er notaður í herbergi með stöðugu hitastigi, sem og með nægilegt afl til að viðhalda loftháðum aðstæðum í öllum flöskunum;

c) síubúnaður, með viðeigandi himnum,

d) greiningartæki fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC),

e) búnaður fyrir ákvörðun á uppleystu súrefni,

f) skilvinda.

II.2.2. **Tilreiðsla steinefnamiðils**

Sjá lið I.6.2. vegna tilreiðslu á stofnlausnum.

10 ml af a-lausn er blandað í 800 ml af þynningarvatni, 1 ml af b-, c- og d-lausn bætt við og fyllt upp að 1 lítra með þynningarvatni.

II.2.3. **Tilreiðsla og formeðhöndlun á sáði**

Sáðið má koma úr ýmsum uppsprettum: virkri seyru, skólpfrárennsli, yfirborðsvatni, jarðvegi eða úr blöndu af þessu.

Sjá liði I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

II.2.4. **Undirbúningur á flöskum**

Sem dæmi, setjið 800 ml skammta af steinefnamiðli í tveggja lítra keiluflöskur og bætið við nægilegu magni af stofnlausnum prófunar- og viðmiðunarefnanna í hverja flösku til að fá styrk íðefnis upp í jafngildi 10–40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í lítra. Athugið pH-gildin og stillið, ef nauðsyn krefur, í 7,4. Sáið í flöskurnar með virkri seyru eða öðru sáði (sjá lið I.6.4) þannig að lokastyrkur sé ekki meiri en 30 mg af svifögnum í lítra. Tilreiðið einnig samanburð með sáði í steinefnamiðlinum en án prófunar- eða viðmiðunaríðefnis.

Notið, ef þörf krefur, eitt ílát til að kanna möguleg hamlandi áhrif prófunaríðefnisins með því að sá í lausn sem inniheldur, í steinefnamiðlinum, sambærilega styrki af bæði prófunar- og viðmiðunaríðefni.

Notið einnig, ef þarf, aðra dauðhreinsaða flösku til að athuga hvort prófunaríðefnið brotnar niður án tilstillis lífvera með því að nota lausn af íðefninu án sáðs (sjá lið I.6.6).

Gerið að auki forkönnun til að ákvarða líklegt umfang ásogs, og þar með hvort prófunin hentar fyrir íðefnið (sjá töflu 1), ef grunur er um að prófunaríðefnið ásogist umtalsvert á gler, seyru o.s.frv. Setjið upp flösku með prófunarefninu, sáði og dauðhreinsandi efni.

Fyllið allar flöskurnar upp að 1 lítra með steinefnamiðli og takið sýni eftir blöndun úr hverri flösku til að ákvarða upphafsstyrk á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (sjá 4. lið í 2. viðbæti). Hyljið flöskuopin, t.d. með álpappír, þannig að loftskipti séu frjáls milli flasknanna og andrúmsloftsins í umhverfinu. Setjið ílátin síðan í hristarann til að hefja prófunina.

II.2.5. **Fjöldi flaskna í dæmigerðri prófun**

1. og 2. flaska: Prófunarsviflausn

3. og 4. flaska: Sáðblankur

5. flaska: Verkferlissamanburður

æskilegur og þegar þörf krefur:

6. flaska: Dauðhreinsaður samanburður án lífvera

7. flaska: Ásogssamanburður

8. flaska: Eiturhrifasamanburður

Sjá einnig lið I.6.7.

II.2.6. **Framkvæmd prófunarinnar**

Í allri prófuninni skal tvítaka ákvarðanir á styrk uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) í hverri flösku með þekktu millibili og nægilega oft til að hægt sé að ákvarða upphaf 10 daga gluggans og hundraðshluta fjarlægingar við lok 10 daga gluggans. Takið aðeins lágmarksmagn af prófunarsviflausninni fyrir hverja ákvörðun.

Fyrir sýnatökuna skal bætt fyrir tap vegna uppgufunar úr flöskunum með því að bæta við þynningarvatni (I.6.1) í nauðsynlegu magni ef þarf. Blandið ræktunarmiðlinum vandlega saman áður en sýni er tekið og tryggið að efni sem loðir við veggi ílátsins leysist upp eða dreifist fyrir sýnatöku. Síið með himnusíu eða skiljið í skilvindu (sjá 4. lið í 2. viðbæti) strax eftir að sýnið hefur verið tekið. Greinið síuð eða skilin sýnin sama dag eða geymið að öðrum kosti við 2–4 °C í hámark 48 klst. eða undir - 18 °C fyrir lengri tíma.

II.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

II.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Reiknið út hundraðshluta niðurbrots á tíma t eins og gefið er upp skv. I.7.1 (ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)) og valkvætt, skv. I.7.2 (sértæk greining).

Skráið allar niðurstöður á gagnablöðin sem fylgja.

II.3.2. **Gildi niðurstaðna**

Sjá lið I.5.2.

II.3.3. **Skýrslugjöf**

Sjá lið I.8.

II.4. GAGNABLAÐ

Dæmi um gagnablað er gefið hér á eftir.

PRÓFUN Á NIÐURBROTI Á UPPLEYSTU, LÍFRÆNU KOLEFNI (DOC)

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: ... mg íðefnis í lítra lausnar

Upphafsstyrkur í miðli, t^0: ... mg íðefnis í lítra lausnar

4. **SÁÐ**

Uppspretta:

Veitt meðhöndlun:

Formeðhöndlun, ef einhver:

Styrkur svifagna í hvarfblöndu: mg/l

5. **ÁKVARÐANIR Á KOLEFNI**

Kolefnisgreiningartæki:

	Flaska nr.		uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eftir n daga (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Prófunaríðefni með sáði	1	a_1					
		a_2					
		a, meðaltal $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, meðaltal $C_{b(t)}$					

	Flaska nr.		uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eftir n daga (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Sáðblankur án prófunaríðefnis	3	C_1					
		C_2					
		C, meðaltal $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, meðaltal $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **MAT Á ÓUNNUM GÖGNUM**

Flaska nr.		% niðurbrot eftir n daga				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Meðaltal (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Ekki skal taka meðaltal af D_1 og D_2 ef á þeim er umtalsverður munur.

Athugasemd: svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunaríðefnið og eiturhrifasamanburðinn.

7. **SAMANBURÐUR ÁN LÍFVERA** (valkvætt)

	Tími (dagar)	
	0	t
styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (mg/l) í dauðhreinsuðum samanburði	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

% niðurbrot án tilstillis lífvera = $\frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(0)}} \times 100$

8. **SÉRTÆK EFNAGREINING** (valkvæð)

	leifar af prófunaríðefni við lok prófunar (mg/l)	% frumniðurbrot
Dauðhreinsaður samanburður	S_b	$C_{s(t)}$

	leifar af prófunaríðefni við lok prófunar (mg/l)	% frumniðurbrot
Ísáður prófunarmiðill	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III. HLUTI **BREYTT OECD-SKIMUNARPRÓFUN** (Aðferð C.4-B)

III.1. GRUNDVÖLLUR AÐFERÐARINNAR

Í mælt rúmmál steinefnamiðils, sem inniheldur þekktan styrk af prófunarefninu (10–40 mg uppleyst, lífrænt kolefni/lítra), sem nafngildi og einu uppsprettu lífræns kolefnis, er sáð 0,5 ml af frárennsli í hvern lítra af miðli. Blandan er loftblönduð í myrkri eða dreifðu ljósi við 22 ± 2 °C.

Fylgst er með niðurbroti með tíðri greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) á 28 daga tímabili. Umfang lífniðurbrots er reiknað út með því að setja fram styrkinn af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) sem er fjarlægt (leiðrétt fyrir því í blanksamanburðinum með sáðinu) sem hundraðshluta af upphafsstyrknum. Umfang frumlífniðurbrots má einnig reikna út frá viðbótarefnagreiningu við upphaf og lok ræktunar.

III.2. LÝSING Á AÐFERÐINNI

III.2.1. Búnaður

a) Keiluflöskur, t.d. 250 ml til tveggja lítra, með hliðsjón af rúmmálinu sem þarf fyrir greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC);

b) hristari — sem tekur keiluflöskurnar, annað hvort með sjálfvirkri hitastýringu eða sem er notaður í herbergi með stöðugu hitastigi, sem og með nægilegt afl til að viðhalda loftháðum aðstæðum í öllum flöskunum;

c) síubúnaður, með viðeigandi himnum;

d) greiningartæki fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC);

e) búnaður fyrir ákvörðun á uppleystu súrefni;

f) skilvinda.

III.2.2. **Tilreiðsla steinefnamiðils**

Sjá lið I.6.2. vegna tilreiðslu á stofnlausnum.

10 ml af a-lausn er blandað í 80 ml af þynningarvatni, 1 ml af b-, c- og d-lausn bætt við og fyllt upp að 1 lítra með þynningarvatni.

Í þessari aðferð eru aðeins notaðir 0,5 ml af frárennsli/lítra sem sáð og því getur þurft að styrkja miðilinn með snefilefnum og vaxtarþáttum. Það er gert með því að bæta 1 ml af hverri eftirtalinna lausna í hvern lítra lokamiðils:

Snefilefnalausn:

Mangansúlfattetrahýdrat, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Bórsýra, H_3BO3	57,2 mg
Sinksúlfatheptahýdrat, $SnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammóníumheptamólýbdat, $(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Járn-klósamband ($FeCl_3$ etýlendíamíntetraediksýra)	100,0 mg
Leysið upp og fyllið að 1000 ml með þynningarvatni	

Vítamínlausn:

Gerkjarni	15,0 mg

Leysið gerkjarnann upp í 100 ml af vatni. Dauðhreinsið með síun í gegnum 0,2 míkrona himnu eða gerið alltaf nýja lausn.

III.2.3. **Tilreiðsla og formeðhöndlun á sáði**

Sáð er fengið úr annars stigs frárennsli frá hreinsistöð eða rannsóknarstofueiningu sem tekur aðallega við heimilisskólpi. Sjá liði I.6.4.2. og I.6.5.

Notaðir eru 0,5 ml í hvern lítra af steinefnamiðli.

III.2.4**.** **Undirbúningur á flöskum**

Sem dæmi, setjið 800 ml skammta af steinefnamiðli í tveggja lítra keiluflöskur og bætið við nægilegu magni af stofnlausnum prófunar- og viðmiðunarefnanna í hverja flösku til að fá styrk íðefnis upp í jafngildi 10–40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í hvern lítra. Athugið pH-gildið og stillið, ef nauðsyn krefur, í 7,4. Sáið í flöskurnar með skólpfrárennsli, 0,5 ml/lítra (sjá lið I.6.4.2). Tilreiðið einnig samanburð með sáði í steinefnamiðlinum en án prófunar- eða viðmiðunaríðefnis.

Notið, ef þörf krefur, eitt ílát til að kanna möguleg hamlandi áhrif prófunaríðefnisins með því að sá í lausn sem inniheldur, í steinefnamiðlinum, sambærilega styrki af bæði prófunar- og viðmiðunaríðefni.

Notið einnig, ef þarf, aðra dauðhreinsaða flösku til að athuga hvort prófunaríðefnið brotnar niður án tilstillis lífvera með því að nota lausn af íðefninu án sáðs (sjá lið I.6.6).

Gerið að auki forkönnun til að ákvarða líklegt umfang ásogs, og þar með hvort prófunin hentar fyrir íðefnið (sjá töflu 1), ef grunur er um að prófunaríðefnið ásogist umtalsvert á gler, seyru o.s.frv. Setjið upp flösku með prófunarefninu, sáði og dauðhreinsandi efni.

Fyllið allar flöskurnar upp að 1 lítra með steinefnamiðli og takið sýni eftir blöndun úr hverri flösku til að ákvarða upphafsstyrk á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (sjá 4. lið í 2. viðbæti). Hyljið flöskuopin, t.d. með álpappír, þannig að loftskipti séu frjáls milli flasknanna og andrúmsloftsins í umhverfinu. Setjið ílátin síðan í hristarann til að hefja prófunina.

III.2.5. **Fjöldi flaskna í dæmigerðri prófun**

1. og 2. flaska: prófunarsviflausn

3. og 4. flaska: sáðblankur

5. flaska: verkferlissamanburður

og æskilegt og þegar þörf krefur:

6. flaska: dauðhreinsaður samanburður án lífvera

7. flaska: samanburður vegna ásogs

8. flaska: eiturhrifasamanburður

Sjá einnig lið 1.6.7.

III.2.6. **Framkvæmd prófunarinnar**

Í allri prófuninni skal tvítaka ákvarðanir á styrk uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) í hverri flösku með þekktu millibili og nægilega oft til að hægt sé að ákvarða upphaf 10 daga gluggans og hundraðshluta fjarlægingar við lok 10 daga gluggans. Takið aðeins lágmarksmagn af prófunarsviflausninni fyrir hverja ákvörðun.

Fyrir sýnatökuna skal bætt fyrir tap vegna uppgufunar úr flöskunum með því að bæta við þynningarvatni (I.6.1) í nauðsynlegu magni ef þarf. Blandið ræktunarmiðilinn vandlega áður en sýni er tekið og tryggið að efni sem loðir við veggi ílátsins leysist upp eða dreifist fyrir sýnatöku. Síið með himnusíu eða skiljið í skilvindu (sjá 4. lið í 2. viðbæti) strax eftir að sýnið hefur verið tekið. Greinið síuð eða skilin sýnin sama dag eða geymið að öðrum kosti við 2–4 °C í hámark 48 klst. eða undir 18 °C fyrir lengri tíma.

III.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

III.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Reiknið út hundraðshluta niðurbrots á tíma t eins og gefið er upp skv. I.7.1 (ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)) og valkvætt, skv. I.7.2 (sértæk greining).

Skráið allar niðurstöður á gagnablöðin sem fylgja.

III.3.2. Gildi niðurstaðna

Sjá lið I.5.2.

III.3.3. Skýrslugjöf

Sjá lið I.8.

III.4. GAGNABLAÐ

Dæmi um gagnablað er gefið hér á eftir

BREYTT OECD-SKIMUNARPRÓFUN

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: ... mg/lítra sem íðefni

Upphafsstyrkur í miðli, t_0: ... mg/lítra sem íðefni

4. **SÁÐ**

Uppspretta:

Veitt meðhöndlun:

Formeðhöndlun, ef einhver:

Styrkur svifagna í hvarfblöndu: mg/l

5. ÁKVARÐANIR Á KOLEFNI

Kolefnisgreiningartæki:

	Flaska nr.		uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eftir n daga (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Prófunaríðefni með sáði	1	a_1					
		a_2					
		a, meðaltal $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, meðaltal $C_{b(t)}$					
Sáðblankur án prófunaríðefnis	3	C_1					
		C_2					
		C, meðaltal $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, meðaltal $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **MAT Á ÓUNNUM GÖGNUM**

Flaska nr.		% niðurbrot eftir n daga				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Meðaltal (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Ekki skal taka meðaltal af D_1 og D_2 ef á þeim er umtalsverður munur.

Athugasemd: svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunaríðefnið og eiturhrifasamanburðinn.

7. **SAMANBURÐUR ÁN LÍFVERA** (valkvætt)

	Tími (dagar)	
	0	t
styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (mg/l) í dauðhreinsuðum samanburði	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ niðurbrot án tilstillis lífvera} = \frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(0)}} \times 100$$

8. **SÉRTÆK EFNAGREINING** (valkvæð)

	leifar af prófunaríðefni við lok prófunar (mg/l)	% frumniðurbrot
Dauðhreinsaður samanburður	S_b	
Ísáður prófunarmiðill	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. HLUTI PRÓFUN Á KOLTVÍSÝRINGSÚTLOSUN (Aðferð C.4-C)

IV.1. GRUNDVÖLLUR AÐFERÐARINNAR

Mælt rúmmál af ísáðum steinefnamiðli sem inniheldur þekktan styrk af prófunaríðefninu (10–20 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eða heildarmagn lífræns kolefnis (TOC/l) á lítra) sem nafngildi og einu uppsprettu lífræns kolefnis, er loftblandað með því að leiða koltvísýringslaust loft í gegnum það á stýrðum hraða í myrkri eða dreifðu ljósi. Fylgst er með niðurbroti í 28 daga með því að ákvarða koltvísýrings-magnið sem myndast en koltvísýringurinn binst við baríum- eða natríumhýdroxíð og er mældur með títrun á hýdroxíðleif eða sem ólífrænt kolefni. Magnið af koltvísýringi, sem myndast úr prófunaríðefninu (leiðrétt fyrir því sem kemur úr sáðblanknum), er gefið upp sem hundraðshluti af fræðilegum koltvísýringi ($ThCO_2$). Umfang lífniðurbrots má einnig reikna út frá viðbótargreiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) við upphaf og lok ræktunar.

IV.2. LÝSING Á AÐFERÐINNI

IV.2.1. **Búnaður**

a) Tveggja til fimm lítra flöskur, allar búnar loftunarröri, sem nær næstum til botns ílátsins, og úttaksopi,

b) segulhræribúnaður, þegar verið er að meta torleysanleg íðefni,

c) gasísogsflöskur,

d) tæki til að stýra og mæla loftflæði,

e) búnaður til að hreinsa burt koltvísýring og fá fram loft sem er laust við koltvísýring en einnig má nota blöndu af koltvísýringslausu súrefni og koltvísýringslausu köfnunarefni, úr gashylkjum, í réttum hlutföllum (20% O_2: 80 % N_2),

f) búnaður til ákvörðunar á koltvísýringi, annaðhvort með títrun eða einhvers konar greiningartæki fyrir ólífræn kolefni,

g) himnusíunarbúnaður (valkvæður),

h) greiningartæki fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) (valkvætt).

IV.2.2. **Tilreiðsla steinefnamiðils**

Sjá lið I.6.2. vegna tilreiðslu á stofnlausnum

10 ml af a-lausn er blandað í 800 ml af þynningarvatni, 1 ml af b-, c- og d-lausn bætt við og fyllt upp að 1 lítra með þynningarvatni.

IV.2.3. **Tilreiðsla og formeðhöndlun sáðs**

Sáðið má koma úr ýmsum uppsprettum: virkri seyru, skólpfrárennsli, yfirborðsvatni, jarðvegi eða úr blöndu af þessu.

Sjá liði I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

IV.2.4. **Undirbúningur á flöskum**

Eftirfarandi dæmi um rúmmál og þyngd eru tilgreind fyrir 5 lítra flöskur sem innihalda 3 l af sviflausn. Ef minna rúmmál er notað skal breyta gildunum samkvæmt því en tryggja að hægt sé að mæla nákvæmlega koltvísýringinn sem myndast.

Bætið 2400 ml af steinefnamiðli í hverja 5 lítra flösku. Bætið við hæfilegu rúmmáli af tilbúinni virkri seyru (sjá liði I.6.4.1 og I.6.5) til að styrkur svifagna sé ekki meiri en 30 mg/l í lítrunum þremur af ísáðu lokablöndunni. Einnig má byrja á að þynna tilbúnu seyruna til að mynda sviflausn með 500–1000 mg/l í steinefnamiðlinum áður en bætt er við deiliskammti af henni út í innihald 5 lítra flöskunnar til að fá styrkinn 30 mg/l; þetta tryggir meiri nákvæmni. Nota má aðrar uppsprettur af sáði (sjá lið I.6.4.2).

Loftblandið þessar ísáðu blöndur með CO_2-lausu lofti yfir nótt til að hreinsa koltvísýring úr kerfinu.

Prófunar- og viðmiðunarefnin eru sett, hvort í sínu lagi og í þekktu rúmmáli af stofnlausnum, í flöskur í samhliða prófunum til að fá styrkleika, með íbættu íðefnunum, upp á 10–20 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eða heildarmagni lífræns kolefnis (TOC) á lítra; sumar flöskurnar eru hafðar án íbættra íðefna sem sáðsamanburður. Bætið torleysanlegum efnum beint í flöskurnar eftir þyngd eða rúmmáli eða meðhöndlið þau eins og lýst er í 3. viðbæti.

Notið eina flösku, ef þörf krefur, til að kanna möguleg hamlandi áhrif prófunaríðefnisins með því að bæta bæði prófunar- og viðmiðunaríðefnunum við í sama styrk og er til staðar í hinum flöskunum.

Notið einnig, ef þarf, dauðhreinsaða flösku til að athuga hvort prófunaríðefnið brotnar niður án tilstillis lífvera með því að nota lausn af íðefninu án sáðs (sjá lið I.6.6). Dauðhreinsið með því að bæta við eiturefni í hæfilegum styrk.

Aukið rúmmál sviflausna í öllum flöskunum í 3 l með því að bæta við steinefnamiðli sem áður hefur verið loftblandaður með CO_2-lausu lofti. Valfrjálst er hvort tekin eru sýni fyrir greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (sjá 4. lið í 2. viðbæti) og/eða sértæka greiningu. Tengið frásogsflöskurnar við loftúttökin á flöskunum.

Ef baríumhýdroxíð er notað skal tengja þrjár frásogsflöskur, sem hver inniheldur 100 ml af 0,0125 M baríumhýdroxíðlausn, í röð við hverja 5 lítra flösku. Lausnin verður að vera laus við súlfatútfellingar og karbónat og ákvarða þarf styrkleika hennar rétt fyrir notkun. Ef natríumhýdroxíð er notað skal tengja tvær gildrur, þá síðari sem samanburð til að sýna fram á að allur koltvísýringur hafi frásogast í þá fyrri. Frásogsflöskur með sermisflöskulokum eru hentugar. Bætið 200 ml af 0,05 M natríumhýdroxíði í hverja flösku en það er nægilegt til að taka við heildarmagni koltvísýrings sem hefur losnað út þegar prófunaríðefnið er að fullu brotið niður. Natríumhýdroxíðlausnin inniheldur snefil af karbónati, jafnvel þegar hún er nýtilreidd, og þetta er leiðrétt með því að draga karbónatið í blanklausninni frá.

IV.2.5. **Fjöldi flaskna í dæmigerðri prófun**

1. og 2. flaska: Prófunarsviflausn

3. og 4. flaska: Sáðblankur

5. flaska: Verkferlissamanburður

og æskileg og þegar þörf krefur:

6. flaska: Dauðhreinsaður samanburður án lífvera

7. flaska: Eiturhrifasamanburður

Sjá einnig lið I.6.7.

IV.2.6. **Framkvæmd prófunarinnar**

Hefjið prófunina með því að leiða 30–100 ml/mínútu af CO_2-lausu lofti í gegnum sviflausnirnar. Takið sýni reglubundið af ísogsefninu fyrir koltvísýring til greiningar á CO_2-innihaldi. Mælt er með að fyrstu 10 dagana séu greiningar gerðar annan eða þriðja hvern dag, og síðan fimmta hvern dag fram að 28. degi, til að finna 10 daga gluggann.

Takið sýni (valkvætt) á 28. degi fyrir greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) og/eða sértæka greiningu, mælið sýrustig sviflausnarinnar og bætið 1 ml af óblandaðri saltsýru í hverja flösku; loftið flöskurnar yfir nótt til að hreinsa út koltvísýringinn sem er til staðar í prófunarsviflausnunum. Gerið síðustu greininguna á koltvísýringsútlosun á 29. degi.

Þá daga sem mælingar eru gerðar á CO_2 skal aftengja ísogsglasið með baríumhýdroxíði næst flöskunni og títra hýdroxíðlausnina með 0,05 M HCl og nota fenólþalín sem litvísi. Færið ísogsglösin sem eftir eru einu sæti nær flöskunni og setjið nýtt ísogsglas með 100 ml af nýju 0,0125 M baríumhýdroxíði á fjarlægari endann á röðinni. Títrið eftir því sem þarf, t.d. ef umtalsverðar útfellingar sjást í fyrstu gildrunni og áður en nokkrar sjást í næstu, eða a.m.k. vikulega. Þegar NaOH er notað sem ísogsefni má einnig taka lítið sýni með sprautu (eftir eiginleikum kolefnisgreiningartækisins sem notað er) af natríumhýdroxíðlausninni í ísogsglasinu næst flöskunni. Sprautið sýninu í IC-hluta kolefnisgreiningartækisins til að greina beint koltvísýringinn sem hefur losnað út.

Ekki greina innihald seinni gildrunnar fyrr en í lok prófunarinnar til að leiðrétta fyrir hvers kyns koltvísýringsyfirfærslu.

IV.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

IV.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Eftir títrun er magnið af CO_2 sem er fast í ísogsglasi gefið með:

$$\text{mg } CO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

þar sem:

V = það rúmmál HCl sem er notað við títrun á 100 ml í ísogsglasinu (ml)

C_B = styrkur baríumhýdroxíðlausnarinnar (M)

C_A = styrkur saltsýrulausnarinnar (M)

ef C_B er 0,0125 M og C_A er 0,05 M, er títrun fyrir 100 ml af baríumhýdroxíði 50 ml og þyngd CO_2 er gefin með:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml títraðs HCl} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Til að umreikna títrað rúmmál HCl í mg af mynduðu CO er stuðullinn í þessu tilviki 1,1.

Þyngd CO_2 sem myndast vegna sáðsins eins og sér og vegna sáðsins og prófunaríðefnisins er reiknað út með því að nota viðkomandi títrunargildi og mismunurinn er þyngdin á CO_2 sem myndast vegna prófunaríðefnisins eins og sér.

Til dæmis, ef sáðið eitt og sér gefur títrunina 48 ml og sáð auk prófunaríðefnis gefur 45 ml, er

CO_2 frá sáðinu = 1,1 x (50–48 = 2,2 mg

CO_2 frá sáðinu auk prófunaríðefnis = 1,1 x (50–45 = 5,5 mg

og því er þyngd CO_2 sem hefur myndast vegna prófunaríðefnisins 3,3 mg.

Hundraðshluti lífniðurbrots er reiknaður út frá:

$$\% \text{ niðurbrot} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ myndað} \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg prófunaríðefni bætt við}}$$

eða

$$\% \text{ niðurbrot} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ myndað} \times 100}{\text{mg TOC bætt við í prófun} \times 3{,}67}$$

með 3,67 sem breytistuðul (44/12) fyrir kolefni í koltvísýring.

Reiknið hundraðshluta niðurbrots eftir hvert tímabil með því að bæta hundraðshluta fræðilegu koltvísýringsgildanna ($ThCO_2$) sem eru reiknuð út fyrir hvern dag, að þeim tíma, sem þau voru mæld.

Vegna ísogsefna með natríumhýdroxíði skal reikna út magn koltvísýrings sem myndast, gefið upp sem IC (mg), með því að margfalda styrkinn á IC í ísogsefninu með rúmmáli ísogsefnisins.

Reiknið hundraðshluta niðurbrots út frá:

$$\% \text{ af } ThCO_2 = \frac{\text{mg IC flaska - mg IC blankur}}{\text{mg TOC bætt við í prófunaríðefni}} \times 100$$

Reiknið út fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (valkvætt) eins og lýst er í lið I.7. Skráið þessar og allar aðrar niðurstöður á gagnablöðin sem fylgja.

IV.3.2. **Gildi niðurstaðna**

IC innihald prófunarsviflausnarinnar í steinefnamiðlinum við upphaf prófunarinnar verður að vera minna en 5% af heildarkolefni (TC) og heildarkoltvísýringsútlosun í sáðblankinum við lok prófunarinnar skal venjulega ekki vera yfir 40 mg/l af miðli. Ef gildin sem fást eru hærri en 70 mg CO_2/lítra ber að yfirfara gögnin og tilraunaaðferðina gaumgæfilega.

Sjá einnig lið I.5.2.

IV.3.3. **Skýrslugjöf**

Sjá lið I.8.

IV.4. GAGNABLAÐ

Dæmi um gagnablað er gefið hér á eftir.

PRÓFUN Á KOLTVÍSÝRINGSÚTLOSUN

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: ... mg/lítra sem íðefni

Upphaflegur styrkur í miðli: ... mg/lítra sem íðefni

Heildarkolefni sem bætt er í flösku: … mg C

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **SÁÐ**

Uppspretta:

Veitt meðhöndlun:

Formeðhöndlun ef einhver:

Styrkur svifagna í hvarfblöndu: mg/lítra

Tími (dagur)	CO_2 sem myndast, prófun (mg)		CO_2 sem myndast, blanksýni (mg)		CO_2 sem myndast, uppsafnað (mg) (prófun mínus meðaltal blanksýnis)		$ThCO_2$ uppsafnað $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	Með-altal	3 / 4	með-altal	1	2	1	2	meðaltal
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Athugasemd: svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunaríðefnið og eiturhrifasamanburðinn.

6. **KOLEFNISGREINING** (valkvæð)

Kolefnisgreiningartæki:

Tími (dagur)	Blanksýni mg/l	Prófunaríðefni mg/l
0	$C_{b(o)}$	C_O
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t

(*) Eða við lok ræktunar

$$\% \text{ fjarlægt uppleyst, lífrænt kolefni (DOC)} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **NIÐURBROT ÁN TILSTILLIS LÍFVERA** (valkvætt)

$$\% \text{ niðurbrot án tilstillis lífvera} = \frac{CO_2 \text{ myndun í dauðhreinsuðu í flösku eftir 28 daga (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V. HLUTI **ÖNDUNARPRÓFUN MEÐ ÞRÝSTIMÆLINGU** (Aðferð C.4-D)

V.1. MEGINREGLA AÐFERÐARINNAR

Mælt rúmmál af ísáðum steinefnamiðli sem inniheldur þekktan styrk af prófunaríðefni (100 mg/lítra af prófunarefninu til að gefa a.m.k. sem svarar 50–100 mg fræðilegri súrefnisþörf (ThOD) á lítra) sem nafngildi og einu uppsprettu lífræns kolefnis, er hrært í lokaðri flösku við stöðugt hitastig (± 1 °C eða minna) í allt að 28 daga. Súrefnisnotkun er annaðhvort ákvörðuð með því að mæla magn súrefnis (myndað með rafklofnun), sem þarf til að viðhalda föstu gasrúmmáli í öndunarmælisflöskunni, eða út frá breytingunni á rúmmáli eða þrýstingi (eða þessu tvennu saman) í búnaðinum. Koltvísýringur, sem losnar út, ísogast í lausn af kalíumhýdroxíði eða öðru hentugu ísogsefni. Magn súrefnis, sem prófunaríðefnið tekur upp (leiðrétt fyrir upptöku í sáðblankinn sem er keyrður samhliða), er gefið upp sem hundraðshluti fræðilegrar súrefnisþarfar (ThOD) eða efnafræðilegrar súrefnisþarfar (COD). Einnig er valkvætt að reikna frumlífniðurbrot út frá sértækri viðbótargreiningu, sem er gerð við upphaf og lok ræktunar, og endanlegt lífniðurbrot með greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC).

V.2. LÝSING Á AÐFERÐINNI

V.2.1. **Búnaður**

a) hentugur öndunarmælir,

b) hitastýring, sem heldur hitabreytingum við ± 1 °C eða minna,

c) himnusíunarbúnaður (valkvæður),

d) kolefnisgreiningartæki (valkvætt).

V.2.2. **Tilreiðsla steinefnamiðils**

Sjá lið I.6.2. vegna tilreiðslu á stofnlausnum.

10 ml af a-lausn er blandað í 800 ml af þynningarvatni, 1 ml af b-, c- og d-lausn bætt við og fyllt upp að 1 lítra með þynningarvatni.

V.2.3. **Tilreiðsla og formeðhöndlun sáðs**

Sáðið má koma úr ýmsum uppsprettum: virkri seyru, skólpfrárennsli, yfirborðsvatni og jarðvegi eða blöndu af þessu.

Sjá liði I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. og I.6.5.

V.2.4. **Undirbúningur á flöskum**

Úr stofnlausnunum eru tilreiddar lausnir af prófunaríðefni og viðmiðunaríðefni, hvoru fyrir sig, í steinefnamiðli þannig að styrkur þeirra verði að jafnaði 100 mg íðefnis í lítra (sem gefur a.m.k. sem svarar 50–100 mg fræðilegri súrefnisþörf (ThOD) á lítra).

Fræðileg súrefnisþörf (ThOD) er reiknuð út frá myndun á ammóníumsöltum nema gert sé ráð fyrir nítrun en þá skal byggja útreikninginn á nítratmyndun (sjá 2. lið í 2. viðbæti).

Ákvarða skal pH-gildin og stilla, ef nauðsyn krefur, á 7,4 ± 0,2.

Torleysanlegum efnum skal bæta við á síðara stigi (sjá neðar).

Ef ákvarða á eiturhrif prófunaríðefnisins skal tilreiða aðra lausn í steinefnamiðli með bæði prófunaríðefni og viðmiðunaríðefni í sama styrk og í stöku lausnunum.

Ef mæla þarf eðlisefnafræðilega upptöku súrefnis skal tilreiða lausn af prófunaríðefninu, að jafnaði sem svarar 100 mg fræðilegri súrefnisþörf (ThOD) á lítra, sem hefur verið dauðhreinsuð með íblöndun viðeigandi eiturefnis (sjá lið I.6.6).

Setja skal nauðsynlegt rúmmál af lausnum prófunar- og viðmiðunaríðefnisins, hvors um sig, í minnst tvær eins flöskur. Útbúnar eru aðrar flöskur með steinefnamiðli eingöngu (fyrir sáðsamanburð) og, ef þörf krefur, með blönduðu prófunar- og viðmiðunaríðefnislausninni og dauðhreinsuðu lausninni.

Ef prófunaríðefnið er torleysanlegt skal setja það beint í lausnina á þessu stigi, eftir þyngd eða rúmmáli, eða meðhöndla það eins og lýst er í 3. viðbæti. Kalíumhýdroxíði, sódakalkstöflum eða öðru ísogsefni er bætt í CO_2-ísogshólfin.

V.2.5. **Fjöldi flaskna í dæmigerðri prófunarkeyrslu**

1. og 2. flaska: prófunarsvifblanda

3. og 4. flaska: sáðblankur

5. flaska: verkferlissamanburður

æskilegt, og þegar þörf krefur:

6. flaska: dauðhreinsaður samanburður

7. flaska: eiturhrifasamanburður

Sjá einnig lið I.6.7.

V.2.6. **Framkvæmd prófunarinnar**

Ílátin eru látin ná tilætluðu hitastigi og sáð í viðeigandi ílát með tilbúinni, virkri seyru eða öðru sáði þannig að styrkur svifagna verði ekki meiri en 30 mg/lítra. Búnaðurinn er settur upp, hræribúnaðurinn settur í gang, gengið úr skugga um loftþéttni og hafin mæling á súrefnisupptöku. Venjulega er ekki þörf á öðru eftirliti en nauðsynlegum álestri og daglegri athugun á því að réttu hitastigi sé við haldið og nægilega hrært í.

Súrefnisupptakan er reiknuð út frá reglulegum og tíðum álestrum þar sem notaðar eru þær aðferðir sem framleiðandi búnaðarins gefur upp. Sýrustig innihalds flasknanna er mælt við lok ræktunarinnar, venjulega eftir 28 daga, sérstaklega ef súrefnisupptaka er lítil eða meiri en $ThOD_{NH4}$ (fyrir efnasambönd sem innihalda köfnunarefni).

Ef þörf krefur eru tekin sýni úr öndunarmælisflöskunum í upphafi og í lokin til greiningar á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eða til sértækar efnagreiningar (sjá 4. lið í 2. viðbæti). Sjá skal til þess, við fyrstu sýnatökuna, að rúmmál prófunarsvifblöndunnar, sem eftir verður í flöskunni, sé þekkt. Ef prófunarefnið inniheldur köfnunarefni er aukning í styrk nítríts og nítrats á 28 dögum ákvörðuð og reiknuð leiðrétting vegna súrefnis sem tekið er upp með nítrun (5. viðbætir).

V.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

V.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Deilt er í súrefnisupptöku prófunaríðefnisins (í mg) eftir tiltekinn tíma (leiðrétt fyrir súrefnisupptöku sáðblankssamanburðar eftir sama tíma) með þyngd prófunaríðefnisins sem notað er. Niðurstaðan er lífræn súrefnisþörf (BOD) sem er gefin upp sem mg súrefnis á mg prófunaríðefnis, þ.e.:

$$\text{lífræn súrefnisþörf} = \frac{(\text{mg af } O_2 \text{ sem prófunaríðefnið tekur upp} - \text{mg af } O_2 \text{ sem blanksýnið tekur upp})}{(\text{mg af prófunaríðefni í flöskunni})}$$

= mg af O_2 á mg prófunaríðefnis

Reiknaður er hundraðshluti lífniðurbrots, annaðhvort út frá:

$$\%\ \text{lífniðurbrots} = \%\ \text{ThOD} = \frac{(\text{lífræn súrefnisþörf (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}}{\text{ThOD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}} \times 100$$

eða út frá:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD (mg af } O_2\text{/mg af íðefni)}}{\text{COD (mg af } O_2\text{/mg af íðefni)}} \times 100$$

Tekið skal fram að þessar tvær aðferðir gefa ekki endilega sama gildið; æskilegt er að fyrri aðferðin sé notuð.

Ef prófunaríðefnið inniheldur köfnunarefni skal nota þá fræðilegu súrefnisþörf (ThOD) (NH_4 eða NO_3) sem svarar til þess sem er vitað eða búist við um nítrun (viðbætir 2.2). Ef nítrun á sér stað en er ekki fullkomin er leiðrétting vegna súrefnis, sem tekið er upp við nítrunina, reiknuð út frá breytingum á styrk nítríts og nítrats (5. viðbætir).

Þegar valkvæðar ákvarðanir á lífrænu kolefni og/eða tilteknu íðefni eru gerðar skal reikna út hundraðshluta niðurbrots eins og lýst er í I.7.

Skrá skal allar niðurstöður á gagnablöðin sem fylgja.

V.3.2. **Gildi niðurstaðna**

Súrefnisupptaka sáðblanksins er venjulega 20−30 mg O_2/lítra og ætti ekki að vera meiri en 60 mg/lítra á 28 dögum. Komi fram hærri gildi en 60 mg/lítra er nauðsynlegt að yfirfara gögnin og tilraunatæknina gaumgæfilega. Ef pH-gildið er ekki á bilinu 6–8,5 og súrefnisupptaka prófunaríðefnisins er minni en 60% ber að endurtaka prófunina með minni styrk prófunaríðefnis.

Sjá einnig lið I.5.2.

V.3.3. **Skýrslugjöf**

Sjá lið I.8.

V.4. **GAGNABLAÐ**

Dæmi um gagnablað er gefið hér á eftir.

ÖNDUNARPRÓFUN MEÐ ÞRÝSTIMÆLINGU

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: ... mg/lítra

Upphafsstyrkur í miðli, C_o: ... mg/lítra

Rúmmál í prófunarflösku (V): … ml

ThOD eða COD: … mg af O_2/mg af prófunarefni (NH_4 or NO_3)

4. **SÁÐ**

Uppspretta:

Meðhöndlun:

Formeðhöndlun, ef einhver hefur verið:

Styrkur svifagna í hvarfblöndunni: … mg/l

5. **SÚREFNISUPPTAKA: LÍFBRJÓTANLEIKI**

		Tími (dagar)											
		0		7		14			21			28	
O_2-uppt. (mg) prófunar-íðefnis	1												
	2												
	a, meðaltal												
O_2-upptaka (mg) blanksýnis	3												
	4												
	b, meðaltal												
Leiðrétt lífræn súrefnisþörf (BOD) (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
Lífræn súrefnisþörf (BOD) á mg prófunar-íðefnis	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												
% niðurbrot $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Meðaltal (*)												

V = rúmmál miðils í prófunarflösku

(*) Ekki skal taka meðaltal af D_1 og D_2 ef umtalsverður munur er á þeim.

Ath.: Nota má svipuð eyðublöð fyrir viðmiðunaríðefnið og eiturhrifasamanburðinn.

6. **LEIÐRÉTTING FYRIR NÍTRUN** (sjá V. viðauka)

Dagur		0	28	Mismunur
i.	Styrkur nítrats (mg N/lítra)			(N)
ii.	Súrefnisjafngildi (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii.	Styrkur nítríts (mg N/lítra)			(N)
iv.	Súrefnisjafngildi (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii. + iv.	Súrefnisjafngildi samanlagt	—	—	

7. **KOLEFNISGREINING** (valkvæð)

Kolefnisgreiningartæki:

Tími (dagur)	Blanksýni mg/lítra	Prófunaríðefni mg/lítra
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Eða við lok ræktunar

$$\% \text{ fjarlægt uppleyst, lífrænt kolefni (DOC)} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SÉRTÆK EFNAGREINING** (valkvæð)

S_b = styrkur í eðlisefnafræðilegum (dauðhreinsuðum) samanburði eftir 28 daga
S_a = styrkur í ísáðri flösku eftir 28 daga

$$\% \text{ niðurbrot án tilstillis lífvera} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **NIÐURBROT ÁN TILSTILLIS LÍFVERA** (valkvætt)

a = súrefnisupptaka í dauðhreinsuðum flöskum eftir 28 daga, (mg)

$$\text{súrefnisupptaka á mg prófunaríðefnis} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

(Sjá 1. og 3. lið)

$$\% \text{ niðurbrots án tilstillis lífvera} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI. HLUTI **PRÓFUN Í LOKAÐRI FLÖSKU** (Aðferð C.4-E)

VI.1 MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Sáð er í lausn af prófunaríðefninu í steinefnamiðli, venjulega 2–5 mg/lítra, með hlutfallslega fáum örverum úr blönduðu þýði og lausnin síðan geymd í algerlega fylltum, lokuðum flöskum í myrkri við stöðugt hitastig. Fylgst er með niðurbroti með greiningu á uppleystu súrefni á 28 daga tímabili. Magn súrefnis sem prófunaríðefnið tekur upp, leiðrétt fyrir upptöku í sáðblankinn sem er keyrður samhliða, er gefið upp sem hundraðshluti fræðilegrar súrefnisþarfar (ThOD) eða efnafræðilegrar súrefnisþarfar (COD).

VI.2 LÝSING Á AÐFERÐINNI

VI.2.1. **Búnaður**

a) Flöskur með glertöppum til mælingar á lífrænni súrefnisþörf (e. *BOD bottle*), t.d. 250–300 ml,

b) vatnsbað eða hitakassi sem getur haldið flöskunum við stöðugt hitastig (± 1 °C eða minna) og í myrkri,

c) stórar glerflöskur (2–5 lítrar) fyrir tilreiðslu á miðlum og til að fylla á flöskurnar sem lífræn súrefnisþörf (BOD) er mæld í,

d) súrefnisrafskaut og súrefnismælir eða búnaður og prófefni fyrir Winkler-títrun.

VI.2.2. Tilreiðsla steinefnamiðils

Sjá lið I.6.2. vegna tilreiðslu á stofnlausnum.

Blandað er saman 1 (einum) ml af a-, b-, c- og d-lausn og fyllt upp að 1 lítra með þynningarvatni.

VI.2.3. **Tilreiðsla sáðsins**

Sáð er venjulega tekið úr annars stigs frárennsli frá hreinsistöð eða rannsóknarstofueiningu sem tekur aðallega við heimilisskólpi. Einnig má nota yfirborðsvatn sem sáð. Að jafnaði er notað frá einum dropa (0,05 ml) upp í 5 ml af síuvökva í hvern lítra af miðli; nauðsynlegt getur verið að prófa sig áfram til að finna ákjósanlegasta rúmmálið fyrir tiltekið frárennsli (sjá liði I.6.4.2 og I.6.5).

VI.2.4. **Undirbúningur á flöskum**

Steinefnamiðilinn er loftblandaður kröftuglega í minnst 20 mínútur. Í hverri prófunarröð er notaður steinefnamiðill úr sömu framleiðslulotu. Miðillinn er að jafnaði tilbúinn til notkunar eftir að hafa staðið í 20 klst. við prófunarhitastigið. Styrkur uppleysts súrefnis er ákvarðaður til samanburðar; gildið á að vera um 9 mg/lítra við 20 °C. Loftmettaði miðillinn er fylltur á ílát og fluttur milli íláta án þess að loftbólur myndist, t.d. með vökvasugu.

Hliðstæðar samstæður af flöskum til mælingar á lífrænni súrefnisþörf eru undirbúnar fyrir ákvörðun á prófunar- og viðmiðunaríðefnunum í samskeiða tilraunaröðum. Settar eru upp nægilega margar flöskur til mælingar á lífrænni súrefnisþörf, þ.m.t. sáðblankar, til að hægt sé að gera a.m.k. tvíteknar mælingar á súrefnisupptöku með ráðgerðu bili á milli prófana, t.d. eftir 0, 7, 14, 21 og 28 daga. Til að tryggt sé að hægt sé að finna 10 daga gluggann getur þurft fleiri flöskur.

Stórar flöskur eru fylltar að hér um bil einum þriðja með fullkomlega loftblönduðum steinefnamiðli. Þá er bætt nægilega miklu af stofnlausnum prófunaríðefnisins og viðmiðunaríðefnisins, hvoru um sig, í aðrar stórar flöskur svo að lokastyrkur íðefnanna verði að jafnaði ekki meiri en 10 mg/lítra. Ekki skal bæta neinum íðefnum í samanburðarblankmiðilinn sem er í enn einni stórri flöskunni.

Til þess að tryggt sé að ekkert hamli virkni sáðsins má styrkur uppleysts súrefnis ekki verða minni en 0,5 mg/lítra í flöskunum sem lífræn súrefnisþörf er mæld í. Þetta takmarkar styrk prófunaríðefnisins við u.þ.b. 2 mg/lítra. Fyrir torniðurbrjótanleg efnasambönd og efnasambönd, sem eru með litla fræðilega súrefnisþörf (ThOD), má hins vegar nota 5–10 mg/lítra. Í sumum tilvikum væri ráðlegt að keyra hliðstæðar raðir af prófunaríðefni með tveimur mismunandi styrkleikum, t.d. 2 og 5 mg/lítra. Venjulega er fræðileg súrefnisþörf (ThOD) reiknuð út frá myndun ammóníumsalta en ef gert er ráð fyrir nítrun eða vitað að hún á sér stað skal reikna gildið út frá nítratmyndun ($ThOD_{NO3}$: sjá 2. lið í 2. viðbæti). Ef nítrun er hins vegar ekki fullkomin en á sér stað er þó leiðrétt fyrir breytingum á styrk nítríts og nítrats sem ákvarða skal með greiningu (sjá 5. viðbæti).

Ef rannsaka á eiturhrif prófunaríðefnisins (t.d. ef áður hefur fengist lágt gildi fyrir lífbrjótanleika) þarf að bæta við einni flöskuröð.

Undirbúin er önnur stór flaska með loftblönduðum steinefnamiðli (fyllt að u.þ.b. einum þriðja af rúmmáli hennar) ásamt prófunaríðefni og viðmiðunaríðefni í lokastyrkleikum sem eru að jafnaði þeir sömu og í hinum stóru flöskunum.

Sáð er í lausnirnar í stóru flöskunum með annars stigs frárennsli (frá einum dropa, um 0,05 ml, upp í 5 ml/lítra) eða með sáði af öðrum uppruna, s.s. árvatni (sjá lið I.6.4.2). Loks eru flöskurnar fylltar upp að kvarðamerki með loftblönduðum steinefnamiðli með því að nota slöngu sem nær alveg til botns í flöskunni svo að fullnægjandi blöndun eigi sér stað.

VI.2.5. **Fjöldi flaskna í dæmigerðri prófunarkeyrslu**

Í dæmigerðri prófunarkeyrslu eru notaðar eftirfarandi flöskur:

— minnst 10 flöskur með prófunaríðefni og sáði (prófunarsvifblanda),

— minnst 10 flöskur með sáði (sáðblankur),

— minnst 10 flöskur með viðmiðunaríðefni og sáði (verkferlissamanburður),

— og, þegar þörf krefur, sex flöskur með prófunaríðefni, viðmiðunaríðefni og sáði (eiturhrifasamanburður). Til að tryggja að hægt sé að finna 10 daga gluggann myndi hins vegar þurfa um tvisvar sinnum fleiri flöskur.

VI.2.6. Framkvæmd prófunarinnar

Hver tilreidd lausn er tafarlaust sett á flöskur í viðkomandi samstæðu flaskna til mælingar á lífrænni súrefnisþörf með slöngu sem leidd er úr neðsta fjórðungi (ekki botni) viðeigandi stórflösku þannig að allar flöskurnar til mælingar á lífrænni súrefnisþörf fyllist algerlega. Slegið er gætilega í flöskurnar til að losna við allar loftbólur. Lausnirnar í núlltímaflöskunum eru greindar tafarlaust með tilliti til uppleysts súrefnis með Winkler-aðferð eða rafskautsaðferð. Hægt er að varðveita innihald flasknanna til síðari greiningar með Winkler-aðferð með því að bæta í þær mangan(II)súlfati og natríumhýdroxíði (fyrsta prófefninu sem notað er í Winkler-aðferðinni). Vandlega lokaðar flöskurnar, sem nú innihalda súrefni sem er bundið sem brúnt, vatnað mangan(III)oxíð, eru geymdar í myrkri við 10–20 °C í mesta lagi í 24 klst. áður en haldið er áfram með þau skref sem eftir eru af Winkler-aðferðinni. Tappi er settur í þær flöskur samhliða prófana sem eftir eru og séð til þess að engar loftbólur verði eftir í þeim og síðan er innihaldið ræktað við 20 °C í myrkri. Jafnframt hverri prófunarröð verður að prófa heila, hliðstæða röð fyrir ákvörðun á ísáða blankmiðlinum. Á 28 daga ræktunartímabilinu eru eigi færri en tvær eins flöskur teknar reglulega (minnst vikulega) úr hverri röð til greiningar á uppleystu súrefni.

Með vikulegri sýnatöku ætti vera hægt að meta hundraðshluta fjarlægingar á 14 daga tímabili en með sýnatöku þriðja eða fjórða hvern dag ætti að vera hægt að finna 10 daga gluggann, sem myndi útheimta hér um bil tvisvar sinnum fleiri flöskur.

Fyrir prófunarefni, sem innihalda köfnunarefni (N), ber að leiðrétta fyrir allri súrefnisupptöku af völdum nítrunar. Í þessu skyni er aðferðin með O_2-rafskauti notuð til að ákvarða styrk uppleysts súrefnis og síðan er tekið sýni úr flöskunni, sem lífræn súrefnisþörf er mæld í, til greiningar á nítríti og nítrati. Súrefnisnotkunin er reiknuð út frá aukningu í styrk nítríts og nítrats (sjá V. viðauka).

VI.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

VI.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Fyrst er lífræn súrefnisþörf (BOD) eftir hvert tímabil reiknuð með því að draga súrefniseyðingu (mg O_2/lítra) í sáðblankinum frá súrefniseyðingu í prófunaríðefninu. Ef deilt er í þessa leiðréttu eyðingu með styrk (mg/lítra) prófunaríðefnisins fæst sértæk, lífræn súrefnisþörf (BOD) sem mg súrefnis á mg prófunaríðefnis. Hundraðshluti lífbrjótanleika er reiknaður með því að deila í sértæka, lífræna súrefnisþörf (BOD) með sértækri, fræðilegri súrefnisþörf (ThOD) (sem er reiknuð samkvæmt viðbæti 2.2) eða efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) (sem er ákvörðuð með greiningu, sjá 3. lið í 2. viðbæti), sem hér segir:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg af } O_2 \text{ sem prófunaríðefnið tekur upp} - \text{mg af } O_2 \text{ sem blanksýnið tekur upp})}{(\text{mg af prófunaríðefni í flöskunni})}$$

= mg af O_2 á mg prófunaríðefnis

$$\% \text{ niðurbrot} = \frac{\text{BOD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}}{\text{ThOD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}} \times 100$$

eða

$$\% \text{ niðurbrots} = \frac{\text{BOD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}}{\text{COD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}} \times 100$$

Tekið skal fram að þessar tvær aðferðir gefa ekki endilega sama gildi; æskilegt er að fyrri aðferðin sé notuð.

Ef prófunaríðefnið inniheldur köfnunarefni skal nota þá fræðilegu súrefnisþörf (ThOD) (NH_4 eða NO_3) sem svarar til þess sem er vitað eða búist við um nítrun (viðbætir 2.2). Ef nítrun á sér stað en er ekki fullkomin er leiðrétting vegna súrefnis, sem tekið er upp við nítrunina, reiknuð út frá breytingum á styrk nítríts og nítrats (5. viðbætir).

VI.3.2. **Gildi niðurstaðna**

Súrefniseyðing í sáðblankinum á ekki að vera meira en 1,5 mg af uppleystu súrefni í lítra eftir 28 daga. Ef hærri gildi en þetta koma fram er nauðsynlegt að yfirfara tilraunatæknina. Styrkur þess súrefnis, sem verður eftir í prófunarflöskunum, má aldrei verða minni en 0,5 mg/lítra. Mæling á svo litlu súrefnisinnihaldi er ekki tekin gild nema unnt sé að mæla svo lág gildi nákvæmlega með aðferðinni sem notuð er við ákvörðun á uppleystu súrefni.

Sjá einnig lið I.5.2.

VI.3.3. **Skýrslugjöf**

Sjá lið I.8.

VI.4. GAGNABLAÐ

Dæmi um gagnablað er gefið hér á eftir.

PRÓFUN Í LOKAÐRI FLÖSKU

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: ... mg/lítra

Upphafsstyrkur í flösku: ... mg/lítra

ThOD eða COD: ... mg O_2/mg prófunarefnis

4. **SÁÐ**

Uppspretta:

Veitt meðhöndlun:

Formeðhöndlun ef einhver:

Styrkur í hvarfblöndunni: ... mg/lítra

5. **ÁKVÖRÐUN Á UPPLEYSTU SÚREFNI (DO)**

Aðferð: Winkler/rafskaut

Flöskugreiningar

Ræktunartími (d)			DO (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Blanksýni (án íðefnis)	1	C_1				
	2	C_2				
Meðaltal	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Prófunaríðefni	1	a_1				
	2	a_2				
Meðaltal	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Athugasemd: Svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunarefni og eiturhrifasamanburð.

6. **LEIÐRÉTTING FYRIR NÍTRUN** (sjá V. viðauka)

Ræktunartími (d)		0	n_1	n_2	n_3
i.	Styrkur nítrats (mg N/lítra)				
ii.	Breyting á styrk nítrats (mg N/lítra)	—			
iii.	Súrefnisjafngildi (mg/lítra)	—			
iv.	Styrkur nítríts (mg N/lítra)				
v.	Breyting á styrk nítríts (mg N/lítra)	—			
vi.	Súrefnisjafngildi (mg/lítra)	—			
iii + vi.	Súrefnisjafngildi samanlagt (mg/lítra)	—			

7. **EYÐING UPPLEYSTS SÚREFNIS: % NIÐURBROTS**

	Eyðing eftir n daga (mg/lítra)			
	n_1	n_2	n_3	
1. flaska: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. flaska: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
1. flaska: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times}{\text{prófunarstyrkur} \times \text{ThOD íðefnis}}$				
2. flaska: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times}{\text{prófunarstyrkur} \times \text{ThOD íðefnis}}$				
% D meðaltal (*) = $\frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Ekki skal taka meðaltal ef umtalsverður munur er milli tvítekninga.

m_{to} = gildi í flöskunni á tíma 0
m_{tx} = gildi í flöskunni á tíma x
m_{bo} = meðaltal blankgilda á tíma 0
m_{bx} = meðaltal blankgilda á tíma x

Leiðréttið einnig fyrir nítrun frá iii + vi í lið 6.

8. **EYÐING UPPLEYSTS SÚREFNIS Í BLANKSÝNI**

Súrefnisnotkun í blanksýni: (m_{bo} - m_{b28}) mg/lítra. Þessi upptaka er mikilvæg fyrir gildi prófunarinnar. Hún á að vera minni en 1,5 mg/lítra.

VII. HLUTI **MITI-PRÓFUN** (Aðferð C.4-F)

VII.1. GRUNDVÖLLUR AÐFERÐARINNAR

Súrefnisupptaka í hrærðri lausn eða svifblöndu af prófunaríðefninu í steinefnamiðli, sem sáð hefur verið í með sérræktuðum, óaðlöguðum örverum, er mæld sjálfvirkt í 28 daga í myrkvuðum, lokuðum öndunarmæli við 25 ± 1 °C. Koltvísýringurinn, sem losnar út, er látinn ísogast í sódakalk. Lífbrjótanleiki er settur fram sem súrefnisupptaka (leiðrétt fyrir upptöku í blanksýni) í hundraðshlutum af fræðilegri súrefnisþörf (ThOD). Hundraðshluti frumlífniðurbrots er einnig reiknaður út frá frekari sértækri efnagreiningu, sem gerð er við upphaf og lok ræktunar og, valkvætt, með greiningu á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC).

VII.2. LÝSING Á AÐFERÐINNI

VII.2.1. **Búnaður**

a) Sjálfvirkur raflausnarmælir fyrir lífræna súrefnisþörf (BOD) eða öndunarmælir, venjulega búinn sex flöskum sem eru 300 ml hver og með bollum fyrir CO_2-ísogsefni,

b) rými með stöðugu hitastigi og/eða vatnsbað við 25 °C ± 1 °C eða minna,

c) himnusíunarbúnaður (valkvæður),

d) kolefnisgreiningartæki (valkvætt).

VII.2.2. **Tilreiðsla steinefnamiðils**

Tilreiddar eru eftirfarandi stofnlausnir með prófefnum af greiningarhreinleika og vatni (I.6.1.):

a) mónókalíumdíhýdrógenortófosfat, KH_2PO_4 8,50 g

díkalíummónóhýdrógenortófosfat, K_2HPO_4 21,75 g

dínatríummónóhýdrógenortófosfatdódekahýdrat, $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ 44,60 g

ammóníumklóríð, NH_4Cl 1,70 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

pH-gildi lausnarinnar skal vera 7,2.

b) magnesíumsúlfatheptahýdrat, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 22,50 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

c) kalsíumklóríð, vatnsfrítt, $CaCl_2$ 27,50 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

d) járn(III)klóríðhexahýdrat, $FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$ 0,25 g

Leysið upp í vatni og fyllið að 1 lítra.

Teknir eru 3 ml af hverri lausn (a-, b-, c- og d-lausn) og fyllt að 1 lítra.

VII.2.3. **Tilreiðsla sáðs**

Tekin eru ný sýni frá ekki færri en 10 stöðum, aðallega á svæðum þar sem margs konar íðefni eru notuð og losuð. Á stöðum á borð við skólphreinsistöðvar, hreinsistöðvar fyrir iðnaðarskólp, ár, fljót og vötn eru tekin eins lítra sýni af seyru, yfirborðsjarðvegi, vatni o.s.frv. og öllu blandað vandlega saman. Eftir að fast efni, sem flýtur á vökvanum, hefur verið fjarlægt er hann látinn standa og pH-gildi flotsins stillt á 7 ± 1 með natríumhýdroxíði eða fosfórsýru.

Nota skal hæfilega mikið af síuðu flotinu til að fylla lotuvirkt seyruvinnsluílát (e. f*ill-and-draw vessel*) og loftblanda vökvann í um 23 1/2 klst. Henda skal u.þ.b. einum þriðja af heildarrúmmáli flotsins 30 mínútum eftir að loftblöndun hefur verið hætt og bæta jafnmiklu af lausn (með pH-gildið 7) sem inniheldur 0,1% af glúkósa, peptóni og mónókalíumortófosfati, hverju fyrir sig, út í botnfallið efnið og hefja loftblöndun á ný. Þetta ferli er endurtekið einu sinni á dag. Seyrueininguna verður að starfrækja í samræmi við góðar starfsvenjur: frárennsli skal vera tært, hitastigi skal halda við 25 ± 2 °C, pH-gildið skal vera 7 ± 1, seyran skal látin botnfalla vel, loftblöndun á að vera nægileg til að halda blöndunni alltaf vel loftaðri, í henni eiga að vera frumdýr og virkni seyrunnar ber að prófa með samanburði við viðmiðunarefni a.m.k. þriðja hvern mánuð. Ekki skal nota seyruna sem sáð fyrr en hún hefur verið unnin í minnst einn mánuð og ekki eftir að hún hefur verið unnin í fjóra mánuði. Eftir það eru sýni tekin reglulega á minnst 10 stöðum þriðja hvern mánuð.

Til að halda sömu virkni í nýrri og gamalli seyru er blandað saman síuðu floti af virkri seyru, sem verið er að nota, og jafnmiklu af síuðu floti af nýrri blöndu frá 10 stöðum og þessi vökvablanda ræktuð eins og lýst er hér að framan. Taka má seyru til að nota sem sáð 18– 24 klst. eftir að einingin hefur verið mötuð.

VII.2.4. **Undirbúningur á flöskum**

Eftirfarandi sex flöskur eru settar upp:

1. flaska: prófunaríðefni í þynningarvatni, 100 mg/l

2., 3. og 4. flaska: prófunaríðefni í steinefnamiðli, 100 mg/l

5. flaska: viðmiðunaríðefni (t.d. anilín) í steinefnamiðli, 100 mg/l

6. flaska: aðeins steinefnamiðill

Torleysanleg efni eru sett beint í flöskurnar sem tiltekin þyngd eða rúmmál eða farið með þau eins og lýst er í 3. viðbæti, að því undanskildu að ekki má nota leysa eða ýruefni. Ísogsefninu fyrir koltvísýring er bætt í allar flöskurnar í bollunum sem ætlaðir eru til þess. pH-gildi í 2., 3. og 4. flösku er stillt á 7,0.

VII.2.5. **Framkvæmd prófunarinnar**

Í flösku nr. 2, 3 og 4 flösku (prófunarsviflausnir), nr. 5 (virknisamanburður) og nr. 6 (sáðblankur) er sett lítið eitt af sáði svo að styrkur svifagna verði 30 mg/l. Engu sáði er bætt í flösku nr. 1, sem þjónar hlutverki samanburðar án lífvera. Búnaðurinn er settur upp, gengið úr skugga um loftþéttni, hræribúnaðurinn settur í gang og hafin mæling á súrefnisupptöku í myrkri. Athuga skal hitastig, hræribúnað og rafhleðslurita súrefnisupptöku daglega og skrá allar litabreytingar á innihaldi flasknanna. Súrefnisupptaka í flöskunum sex er lesin beint með viðeigandi aðferð, t.d. af sex rása síritanum sem skráir feril lífrænnar súrefnisþarfar (BOD). Við lok ræktunar, venjulega eftir 28 daga, er sýrustig innihalds flasknanna mælt og styrkur prófunaríðefnisins, sem eftir er, og allra milliefna ákvarðaður, svo og styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) þegar um er að ræða vatnsleysanleg efni (viðbætir 2.4). Sérstakrar gætni er þörf ef notuð eru rokgjörn efni. Ef búist er við nítrun skal ákvarða styrk nítrats og nítríts ef unnt er.

VII.3. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

VII.3.1. **Úrvinnsla niðurstaðna**

Deilt er í súrefnisupptöku prófunaríðefnisins (í mg) eftir tiltekinn tíma, leiðrétt fyrir súrefnisupptöku sáðblankssamanburðar eftir sama tíma, með þyngd prófunaríðefnisins sem er notað. Niðurstaðan er lífræn súrefnisþörf (BOD) sem er gefin upp sem mg súrefnis á mg prófunaríðefnis, þ.e.:

$$\text{lífræn súrefnisþörf} = \frac{(\text{mg af } O_2 \text{ sem prófunaríðefnið tekur upp} - \text{mg af } O_2 \text{ sem blanksýnið tekur upp})}{(\text{mg af prófunaríðefni í flöskunni})}$$

= mg O_2 á mg prófunaríðefnis

Hundraðshluti lífniðurbrots fæst síðan með:

$$\% \text{ lífniðurbrots} = \% \text{ ThOD} \quad \frac{\text{lífræn súrefnisþörf (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}}{\text{ThOD (mg af } O_2\text{/mg af prófunaríðefni)}} \times 100$$

Reiknið fræðilega súrefnisþörf (ThOD) fyrir blöndur út frá þáttagreiningu, eins og fyrir einföld efni. Notið viðeigandi fræðilega súrefnisþörf (ThOD) (NH_4 eða NO_3) samkvæmt því hvort nítrun á sér ekki stað eða er alger (viðbætir 2.2). Ef nítrun á sér hins vegar stað en er ekki fullkomin, skal reikna út leiðréttingu fyrir súrefnisupptöku með nítrun út frá breytingum á styrk nítríts og nítrats (5. viðbætir).

Hundraðshluti frumlífniðurbrots er reiknaður út frá tapi á upprunaíðefninu (sjá lið 1.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Hafi orðið tap á prófunaríðefni í flösku nr. 1, sem er notuð til að mæla niðurbrot af völdum eðlisefna-fræðilegra þátta, skal greina frá því og nota styrk prófunaríðefnisins (S_b) í þessari flösku eftir 28 daga til að reikna hundraðshluta lífniðurbrots.

Við ákvarðanir á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (valkvætt) er hundraðshluti endanlegs lífniðurbrots reiknað út frá:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

eins og lýst er í lið I.7.1. Hafi orðið tap á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í flösku nr. 1, sem er notuð til að mæla niðurbrot af völdum eðlisefnafræðilegra þátta, skal nota styrk uppleysts, lífræns kolefnis í þessari flösku til að reikna hundraðshluta lífniðurbrots.

Skrá skal allar niðurstöður á gagnablöðin sem fylgja.

VII.3.2. **Gildi niðurstaðna**

Súrefnisupptaka sáðblanksins er venjulega 20–30 mg O_2/lítra og ætti ekki að vera meiri en 60 mg/lítra á 28 dögum. Komi fram hærri gildi en 60 mg/lítra er nauðsynlegt að yfirfara gögnin og tilraunatæknina gaumgæfilega. Ef pH-gildið er ekki á bilinu 6– 8,5 og súrefnisupptaka prófunaríðefnisins er minni en 60% ber að endurtaka prófunina með minni styrk prófunaríðefnis.

Sjá einnig lið I.5.2.

Prófunin telst ógild ef hundraðshluti niðurbrots á anilíni, reiknað út frá súrefnisupptöku, er ekki yfir 40% eftir sjö daga og 65% eftir 14 daga.

VII.3.3. **Skýrslugjöf**

Sjá lið I.8.

VII.4. GAGNABLAÐ

Dæmi um gagnablað er gefið hér fyrir neðan.

MITI-PRÓFUN (I)

1. **RANNSÓKNARSTOFA**

2. **DAGSETNING VIÐ UPPHAF PRÓFUNAR**

3. **PRÓFUNAREFNI**

Heiti:

Styrkur stofnlausnar: mg íðefnis í lítra lausnar

Upphafsstyrkur í miðli, C_o: ... mg íðefnis í lítra lausnar

Rúmmál hvarfblöndu, V: … ml

ThOD: … mg O_2/1

4. **SÁÐ**

Sýnatökustaðir seyru:

(1)… (6)…

(2)… (7)…

(3)… (8)…

(4)… (9)…

(5)… (10)…

Styrkur svifagna í virkri seyru eftir aðlögun með tilbúnu skólpi = ... mg/l

Rúmmál virkrar seyru á lítra lokamiðils = ... ml

Styrkur seyru í lokamiðli = ... mg/l

5. **SÚREFNISUPPTAKA: LÍFBRJÓTANLEIKI**

Gerð öndunarmælis sem notuð er:

			Tími (dagar)				
			0	7	14	21	28
O_2-upptaka (mg) prófunaríðefnisins	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-upptaka (mg) blanksýnisins	b						
Leiðrétt BOD (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
lífræn súrefnisupptaka á mg prófunaríðefnis	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	1. flaska					
		2. flaska					
		3. flaska					

			Tími (dagar)				
			0	7	14	21	28
% niðurbrots $\frac{\text{lífræn súrefnisþörf}}{\text{fræðileg súrefnisþörf}} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Meðaltal (*)					

(*) Ekki skal taka meðaltal ef umtalsverður munur er milli samhliða prófana.

Ath. Svipaða framsetningu má nota fyrir viðmiðunarefnasambandið.

6. **KOLEFNISGREINING** (valkvæð)

Kolefnisgreiningartæki:

Flaska	DOC				Fjarlægt, uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) í %	Meðaltal
	Mælt		Leiðrétt			
Vatn+ prófunarefni	a				—	—
Seyra+ prófunarefni	b_1		$b_1 - c$			
Seyra+ prófunarefni	b_2		$b_2 - c$			
Seyra+ prófunarefni	b_3		$b_3 - c$			
Blanksamanburður	c		—		—	—

fjarlægt uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) í %: $\frac{a_1 - (b - c)}{a} \times$

7. **GÖGN ÚR SÉRTÆKRI EFNAGREININGU**

	Prófunaríðefnisleif við lok prófunar	% niðurbrots
blankprófun með vatni	S_b	
ísáður miðill	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

% niðurbrots = $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

Reiknið % niðurbrots fyrir flöskur a_1 og a_3, hvora fyrir sig

8. **ATHUGASEMDIR**

Ef til er ferill fyrir lífræna súrefnisþörf (BOD) sem fall af tíma skal láta hann fylgja.

1. viðbætir

SKAMMSTAFANIR OG SKILGREININGAR

DO: Uppleyst súrefni (mg/l) er styrkur uppleysts súrefnis í vatnslausnarsýni

BOD: Lífræn súrefnisþörf (g) er það magn súrefnis sem örverur nota við umbrot prófunarefnasambands, einnig sett fram sem súrefnisupptaka í g á g prófunarefnasambands. (Sjá aðferð C.5).

COD: Efnafræðileg súrefnisþörf (g) er það magn súrefnis sem notað er við oxun prófunarefnasambands með heitu, súru díkrómati; hún er mælikvarði á það hversu mikið af oxanlegu efni er til staðar; einnig sett fram sem súrefnisupptaka í g á g prófunarefnasambands. (Sjá aðferð C.6).

DOC: Uppleyst, lífrænt kolefni er lífrænt kolefni sem er til staðar í lausn eða sem fer í gegnum 0,45 míkrómetra síu eða verður eftir í flotinu eftir skiljun í skilvindu við 40 000 $m \cdot s^{-2}$ (± 4000 g) í 15 mínútur.

ThOD: Fræðileg súrefnisþörf (mg) er heildarmagn súrefnis sem þarf til að oxa tiltekið efni fullkomlega; reiknað út frá sameindaformúlunni (sjá 2. lið í 2. viðbæti) og er einnig sett fram sem mg af súrefni sem þarf fyrir hvert mg af prófunarefnasambandi.

$ThCO_2$: Fræðilegur koltvísýringur (mg) er það magn koltvísýrings sem reiknað er út að myndist úr þekktu eða mældu kolefnisinnihaldi prófunarefnasambandsins þegar það er fullsundrað; einnig gefið upp sem mg af koltvísýringi sem losnar út á hvert mg af prófunarefnasambandi.

TOC: Heildarmagn lífræns kolefnis í sýni er samanlagt magn lífræns kolefnis í lausn og í svifblöndu.

IC: Ólífrænt kolefni

TC: Heildarkolefni er samanlagt magn lífræns kolefnis og ólífræns kolefnis í sýni.

Frumlífniðurbrot:

Breyting á efnafræðilegri byggingu efnis af völdum líffræðilegrar virkni sem leiðir til þess að efnið missir eðliseiginleika sína.

Fullnaðarlífniðurbrot (við loftháðar aðstæður):

Lífniðurbrot sem næst þegar prófunarefnasambandið er fullnýtt af örverum sem leiðir til myndunar koltvísýrings, vatns, ólífrænna salta og nýrra frumuhluta í örverum (lífmassi).

Auðlífbrjótanlegt:

Handahófskennd flokkun á íðefnum sem hafa staðist tilteknar, sértækar skimunarprófanir á fullnaðarlífbrjótanleika; þessar prófanir eru svo strangar að búist er við að slík efni brotni niður hratt og fullkomlega í vatnsumhverfi við loftháðar aðstæður.

Lífbrjótanleg í eðli sínu:

Flokkun á íðefnum þar sem ótvíræðar sannanir eru til um lífniðurbrot (frum- eða fullnaðarlífniðurbrot) í öllum viðurkenndum prófunum á lífbrjótanleika.

Meðhöndlanleiki:

Það hversu auðvelt er að fjarlægja efnasambönd með skólphreinsun með líffræðilegum aðferðum án þess að trufla eðlilegan gang hreinsunarferlanna. Auðlífbrjótanleg efnasambönd eru yfirleitt meðhöndlanleg en það á ekki við um öll efni sem eru lífbrjótanleg í eðli sínu. Ólífrænir ferlar geta einnig haft áhrif.

Biðskeið

Tíminn frá því að sáð er í lausn í niðurbrotsprófun þar til hundraðshluti niðurbrots hefur náð a.m.k. 10%. Biðskeiðið er oft afar breytilegt og ekki samanburðarnákvæmt.

Niðurbrotstími

Tíminn frá því að biðskeiði lýkur þar til 90% af hámarksniðurbroti hafa náðst.

10 daga gluggi

Næstu 10 dagar strax eftir að 10% niðurbroti er náð.

2. viðbætir

ÚTREIKNINGUR OG ÁKVÖRÐUN VIÐEIGANDI SAMANTEKTARÞÁTTA

Aðferðin, sem valin er, ræður því hvaða tilteknu samantektarþætti þarf að nota. Í eftirfarandi lið er því lýst hvernig þessi gildi eru leidd út. Notkun þessara samantektarþátta er lýst í hverri aðferð um sig.

1. **Kolefnisinnihald**

Kolefnisinnihaldið er reiknað út frá þekktri frumefnasamsetningu eða ákvarðað með frumefnagreiningu á prófunarefninu.

2. **Fræðileg súrefnisþörf (ThOD)**

Fræðilega súrefnisþörf (ThOD) má reikna út ef frumefnasamsetning er þekkt eða ákvarða hana með frumefnagreiningu. Fyrir efnasambandið:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

er hún án nítrunar:

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2c + 1/2\ (h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW}\ mg/mg$$

en með nítrun:

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2c + 1/2\ (h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Efnafræðileg súrefnisþörf (COD)**

Efnafræðileg súrefnisþörf (COD) er ákvörðuð samkvæmt aðferð C.6.

4. **Uppleyst, lífrænt kolefni (DOC)**

Uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) er skilgreint sem sá hluti af lífrænu kolefni í hverju íðefni eða efnablöndu í vatni sem fer í gegnum 0,45 míkrómetra síu.

Sýni eru tekin úr prófunarílátunum og síuð strax í síunarbúnaðinum sem búinn er viðeigandi himnusíu. Fyrstu 20 ml (magnið er hægt að minnka þegar notaðar eru litlar síur) af síuvökvanum er hent. Magni upp á 10–20 ml, eða minna ef því er sprautað inn (rúmmálið fer eftir því magni sem þarf fyrir kolefnisgreiningartækið), er haldið eftir fyrir kolefnisgreiningu. Styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) er ákvarðaður með greiningartæki fyrir lífrænt kolefni sem getur mælt nákvæmlega kolefnisstyrk sem er eigi meiri en 10% af upphaflegum styrk uppleysts, lífræns kolefnis í prófuninni.

Síuð sýni, sem ekki er hægt að greina á sama vinnudegi, er hægt að varðveita með geymslu í kæliskáp við 2– 4 °C í 48 klst. eða undir – 18 °C fyrir lengri tímabil.

Athugasemdir:

Himnusíur eru oft gegndreyptar með yfirborðsvirkum efnum til að gera þær vatnssæknar. Því getur sían innihaldið allt að nokkur mg af uppleysanlegu lífrænu kolefni, sem myndi hafa áhrif á ákvarðanir á lífbrjótanleika. Yfirborðsvirk efni og önnur leysanleg, lífræn efnasambönd eru fjarlægð úr síunum með því að sjóða þær þrisvar sinnum í afjónuðu vatni í eina klukkustund í hvert skipti. Síurnar má síðan geyma í vatni í eina viku. Ef notuð eru einnota síuhylki verður að yfirfara hverja framleiðslulotu til að staðfesta að þau gefi ekki frá sér lífrænt kolefni.

Sumar tegundir af himnusíum kunna að ásoga prófunaríðefnið. Því getur verið ráðlegt að sjá til þess að sían haldi ekki í sér prófunaríðefni.

Nota má skiljun í skilvindu við 40 000 $m \cdot sek^{-2}$ (4000 g) í 15 mínútur í stað síunar til að greina á milli heildarmagns lífræns kolefnis (TOC) og uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) í stað síunar. Aðferðin er ekki áreiðanleg við upphafsstyrk < 10 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í lítra, þar eð annaðhvort næst ekki að fjarlægja allar bakteríurnar eða þá að hluti kolefnisins í umfrymi bakteríanna leysist upp aftur.

RITASKRÁ

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, bls 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

3. viðbætir

MAT Á LÍFBRJÓTANLEIKA TORLEYSANLEGRA EFNA

Við prófanir á lífbrjótanleika torleysanlegra efna ber að huga sérstaklega að eftirtöldum atriðum.

Sjaldan er vandkvæðum bundið að taka sýni úr einsleitum vökvum en ráðlegt er að gera föst efni einsleit með viðeigandi aðferðum til að komast hjá skekkjum vegna misleitni (e. *non-homogeneity*) Sýna þarf sérstaka gætni þegar taka þarf dæmigerð sýni upp á nokkur milligrömm úr blöndum íðefna eða efna sem innihalda mikið af óhreinindum.

Nota má ýmiss konar hræriaðferðir í þessum prófunum. Þess skal gætt að hræra ekki meira en þarf til að íðefnið haldist dreift og forðast ofhitun, óhóflega froðumyndun og of mikla skúfkrafta (e. *shear forces*).

Nota má ýruefni til að fá stöðuga dreifilausn með íðefninu. Ýruefnið má ekki vera eitrað fyrir bakteríur og má hvorki vera lífbrjótanlegt né valda froðumyndun við prófunarskilyrðin.

Um leysiefnin gilda sömu viðmiðanir og um ýruefnin.

Ekki er mælt með því að föst burðarefni séu notuð fyrir föst prófunarefni en þau geta hentað fyrir olíukennd efni.

Ef notuð eru hjálparefni á borð við ýruefni, leysa og burðarefni ber einnig að gera blankprófun með hjálparefninu.

Hægt er að nota hverja þessara öndunarprófana, CO_2, BOD og MITI, til að rannsaka lífbrjótanleika torleysanlegra efnasambanda.

RITASKRÁ

— de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

— Gerike, P, The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

4. viðbætir

MAT Á LÍFBRJÓTANLEIKA EFNA SEM TALIÐ ER AÐ SÉU EITRUÐ FYRIR SÁÐIÐ

Þegar auðlífbrjótanleiki efnis er prófaður og það virðist ekki lífbrjótanlegt er ráðlegt að notast við eftirfarandi verklag ef ætlunin er að greina milli hömlunar og óvirkni (Reynolds et al., 1987).

Nota skal svipað eða jafngilt sáð við prófanir á eiturhrifum og lífniðurbroti.

Til að geta metið eiturhrif íðefna, sem rannsökuð eru með prófunum á lífbrjótanleika, má nota eina af eftirtöldum aðferðum eða samsetningu þeirra: hömlun öndunarhraða seyrunnar (prófun á öndunarhömlun í virkri seyru) — tilskipun 87/302/EBE), lífræn súrefnisþörf (BOD) og/eða vaxtarhömlunaraðferðir.

Ef komast á hjá hömlun af völdum eiturhrifa er lagt til að styrkleikar prófunarefnisins, sem eru notaðir í prófunum á auðlífbrjótanleika, séu undir 1/10 af EC_{50}-gildunum (eða undir EC_{20}-gildunum) sem fást við eiturhrifaprófun. Efnasambönd með hærri EC_{50}-gildi en 300 mg/l eru ekki líkleg til að hafa eiturhrif í prófun á auðlífbrjótanleika.

Lægri EC_{50} gildi en 20 mg/l eru líkleg til að valda miklum vandkvæðum í síðari prófunum. Nota skal litla prófunarstyrkleika og er þá nauðsynlegt að nota prófun í lokaðri flösku, sem er bæði ströng og næm, eða nota efni sem eru merkt með ^{14}C. Einnig má aðlaga sáðið og kann þá að vera mögulegt að nota hærri prófunarefnisstyrkleika. Í síðara tilvikinu fer þó forgörðum hið sérstaka gildi prófunarinnar á auðlífbrjótanleika.

RITASKRÁ

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

5. viðbætir

LEIÐRÉTTING FYRIR SÚREFNISUPPTÖKU VEGNA ÁHRIFA NÍTRUNAR

Það veldur lítilli skekkju (ekki meiri en 5%) þótt ekki sé tekið tillit til nítrunar þegar lífbrjótanleiki prófunarefna, sem innihalda ekki N (köfnunarefni), er metinn á grundvelli súrefnisupptöku jafnvel þótt oxun á ammóníum-N í miðlinum sveiflist tilviljanakennt milli prófunarílátanna og blankílátanna. Innihaldi prófunarefnið N geta skekkjurnar á hinn bóginn orðið stórar.

Ef nítrun hefur orðið en er ekki fullkomin má leiðrétta mælda súrefnisupptöku hvarfblöndunnar fyrir því magni súrefnis sem tekið er upp við oxun ammóníums í nítrít og nítrat, með því að ákvarða breytingar á styrk nítríts og nítrats meðan á ræktun stendur með hliðsjón af eftirfarandi jöfnum:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Í heild:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Af jöfnu (1) leiðir að súrefnisupptaka við oxun 28 g af köfnunarefni í mynd ammóníumklóríða (NH_4Cl) í nítrít er 96 g, þ.e. stuðullinn er 3,43 (96/28). Á sama hátt leiðir af jöfnu (3) að súrefnisupptaka við oxun 28 g af köfnunarefni í nítrat er 128 g, þ.e. stuðullinn er 4,57 (128/28).

Þar eð efnahvörfin eiga sér stað hvert á eftir öðru, með því að þeim valda mismunandi bakteríutegundir, er hugsanlegt að styrkur nítríts aukist eða minnki; í síðara tilvikinu myndi þá myndast samsvarandi styrkur nítrats. Súrefnisnotkun við nítratmyndun er því 4,57, margfaldað með aukningu nítratstyrks, en súrefnismagnið, sem tengist nítrítmyndun, er á hinn bóginn 3,43, margfaldað með aukningu nítrítstyrks eða við minnkun styrk nítríts, –3,43 margfaldað með styrkminnkuninni.

Það er:

$$O_2\text{-notkun við nítratmyndun} = 4{,}57 \times \text{aukning nítratstyrks} \quad (4)$$

og

$$O_2\text{-notkun við nítrítmyndun} = 3{,}43 \times \text{aukning nítrítstyrks} \quad (5)$$

og

$$O_2\text{-tap við ummyndun nítríts} = -\ 3{,}43 \times \text{minnkun nítratstyrks} \quad (6)$$

Þar með er

$$O_2\text{-upptaka vegna nítrunar} = \pm\ 3{,}43 \times \text{breyting á nítrítstyrk} + 4{,}57 \times \text{aukning nítratstyrks} \quad (7)$$

og því er

$$O_2\text{-upptaka vegna C-oxunar} = \text{mæld heildarupptaka} - \text{upptaka vegna nítrunar} \quad (8).$$

Ef aðeins er ákvarðað heildarmagn oxaðs N má, sem fyrstu nálgun, einnig reikna súrefnisupptöku vegna nítrunar sem 4,57 × aukningu á oxuðu N.

Leiðrétta gildið fyrir súrefnisupptöku vegna kolefnisoxunar er síðan borið saman við fræðilega súrefnisþörf (ThOD)$_{NH3}$ eins og hún er reiknuð í 2. viðbæti.

C.5. NIÐURBROT — LÍFRÆN SÚREFNISÞÖRF

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með aðferðinni er mæling á lífrænni súrefnisþörf (BOD) fastra eða fljótandi lífrænna efna.

Gögn sem fást með þessari prófun eiga við vatnsleysanleg efnasambönd; hins vegar er einnig hægt, a.m.k. að jafnaði, að prófa rokgjörn efni og efni með litla vatnsleysni.

Aðferðina er aðeins hægt að nota fyrir þau lífrænu prófunarefni sem hafa ekki hamlandi áhrif á bakteríur í þeim styrk sem notaður er í prófuninni. Ef prófunarefnið er ekki leysanlegt í prófunarstyrknum, getur þurft að grípa til sérstakra ráðstafana, s.s. að nota úthljóðsdreifingu, til að fá góða dreifingu prófunarefnisins.

Upplýsingar um eiturhrif íðefnisins geta verið gagnlegar við túlkun á lágum gildum og við val á hæfilegum prófunarstyrk.

1.2. SKILGREINING OG EININGAR

Lífræn súrefnisþörf (BOD) er skilgreind sem sá massi uppleysts súrefnis sem þarf fyrir lífefnafræðilega oxun á tilgreindu rúmmáli lausnar af efninu við stöðluð skilyrði.

Niðurstöðurnar eru gefnar upp sem lífræn súrefnisþörf (BOD) sem nemur grömmum á hvert gramm af prófuðu efni.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Æskilegt er að nota viðeigandi viðmiðunarefni til að athuga virkni sáðsins.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Örverum er sáð í forákvarðað magn af efninu, uppleystu eða dreifðu í viðeigandi vel loftblönduðum miðli, og þær ræktaðar við stöðugan skilgreindan umhverfishita í myrkri.

Lífræna súrefnisþörfin (BOD) er ákvörðuð út frá mismuninum á uppleystu súrefni við upphaf og við lok prófunarinnar. Tímalengd prófunarinnar verður að vera minnst 5 dagar og ekki meira en 28 dagar.

Gerð skal hliðstæða ákvörðun á blanksýni án prófunarefnis.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Ekki er hægt að líta á ákvörðunina á lífrænni súrefnisþörf (BOD) sem gilda ákvörðun á lífbrjótanleika efnis. Einungis er hægt að líta á þessa prófun sem skimunarprófun.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Til undirbúnings er tilreidd lausn eða dreifilausn af efninu til að fá þann styrk miðað við lífræna súrefnisþörf (BOD) sem samrýmist aðferðinni sem notuð er. Lífræna súrefnisþörfin (BOD) er síðan ákvörðuð samkvæmt viðeigandi, staðlaðri landsbundinni eða alþjóðlegri aðferð.

2. GÖGN OG MAT

Lífræn súrefnisþörf (BOD) í undirbúningslausninni er reiknuð samkvæmt völdu stöðluðu aðferðinni og umreiknuð í lífræna súrefnisþörf sem nemur grömmum á hvert gramm af prófuðu efni.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Greina skal frá aðferðinni sem er notuð.

Lífræna súrefnisþörfin skal vera meðaltal af minnst þremur gildum mælingum.

Greina skal frá öllum upplýsingum og athugasemdum sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi, eðlisástand efnisins, eiturhrif þess og eðlislæga samsetningu sem gætu haft gæti áhrif á niðurstöðurnar.

Greina verður frá notkun íblöndunarefnis til að hamla gegn lífrænni nítrun.

4. **HEIMILDIR**

Skrá yfir staðlaðar aðferðir, t.d.:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. NIÐURBROT — EFNAFRÆÐILEG SÚREFNISÞÖRF

1. AÐFERÐ

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með aðferðinni er að mæla efnafræðilega súrefnisþörf (COD) fastra eða fljótandi lífrænna efna með stöðluðum slembiaðferðum, við fastsett rannsóknarstofuskilyrði.

Upplýsingar um efnisformúluna eru gagnlegar fyrir framkvæmd þessarar prófunar og túlkun á niðurstöðunni sem fæst (t.d. halógensölt, járnsölt lífrænna efnasambanda, lífræn klórsambönd).

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Efnafræðileg súrefnisþörf er mælikvarði á oxunarhæfni efnis, gefið upp sem jafngildi þess súrefnismagns sem efnið tekur í sig frá oxandi prófefni við fastsett rannsóknarstofuskilyrði.

Niðurstaðan er gefin upp sem efnafræðileg súrefnisþörf (COD) í grömmum á hvert gramm af prófuðu efni.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Ekki þarf að nota viðmiðunarefni í hvert skipti sem nýtt efni er rannsakað. Þau skulu helst þjóna þeim tilgangi að kvarða aðferðina öðru hvoru og gera samanburð á niðurstöðum mögulegan þegar önnur aðferð er notuð.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Forákvarðað magn af efninu, uppleyst eða dreift í vatni, er oxað með kalíumdíkrómati í sterkum brennisteinssýrumiðli, með silfursúlfati sem hvata, við bakstreymi í tvær klukkustundir. Díkrómatsleifarnar eru ákvarðaðar með títrun með stöðluðu járnammóníumsúlfati.

Ef efnin innihalda klór er kvikasilfursúlfati ([1]) bætt við til að draga úr truflun af klóríði.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Þar sem ákvörðun á efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) er tilviljunarkennd telst hún „oxunarhæfnisvísir“ og er notuð sem slík af því hún er hentug aðferð til að mæla lífrænt efni.

Klóríð getur valdið truflun í þessari prófun; ólífræn afoxandi eða oxandi efni geta einnig valdið truflunum við ákvörðun á efnafræðilegri súrefnisþörf (COD).

Sum hringuð efnasambönd og mörg rokgjörn efni (t.d. styttri fitusýrur) oxast ekki að fullu í þessari prófun.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

Til undirbúnings er tilreidd lausn eða dreifilausn af efninu til að fá sem svarar efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) milli 250 og 600 mg í lítra.

Athugasemdir:

Þegar um er að ræða torleysanleg efni og efni sem dreifast ekki er hægt að vigta fínt mulið efni eða vökvakennt efni, í magni sem svarar til um 5 mg af efnafræðilegri súrefnisþörf (COD), og setja það í tilraunabúnaðinn með vatni.

([1]) Lausnir sem innihalda kvikasilfursölt skulu meðhöndlaðar þannig eftir notkun að það komi í veg fyrir að kvikasilfur dreifist út í umhverfið.

Oft er heppilegt að greina efnafræðilega súrefnisþörf (COD) með afbrigði af aðferðinni, þ.e. í lokuðu kerfi með þrýstijafnara (H. Kelkenberg, 1975), einkum þegar um er að ræða torleysanleg efni. Með þessari breytingu er oft hægt að magngreina efnasambönd sem erfitt er að ákvarða með hefðbundnu aðferðinni — t.d. ediksýru. Aðferðin bregst hins vegar þegar um er að ræða pýridín. Ef kalíumdíkrómat styrkurinn, eins og hann er gefinn upp í 1. heimild, er hækkaður í 0,25 N (0,00416 M) er auðveldara að vega beint þau 5–10 mg af efni sem eru nauðsynleg fyrir ákvörðun á efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) þeirra efna sem eru torleyst í vatni (2. heimild).

Að öðru leyti er efnafræðileg súrefnisþörf (COD) síðan ákvörðuð samkvæmt viðeigandi, staðlaðri landsbundinni eða alþjóðlegri aðferð.

2. GÖGN OG MAT

Efnafræðileg súrefnisþörf (COD) í tilraunaflöskunni er reiknuð samkvæmt valinni staðlaðri aðferð og umreiknuð í efnafræðilega súrefnisþörf sem nemur grömmum á hvert gramm af prófuðu efni.

3. SKÝRSLUGJÖF

Greina skal frá tilvísunaraðferðinni sem er notuð.

Efnafræðilega súrefnisþörfin skal vera meðaltal af minnst þremur mælingum. Tilgreina skal allar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna, einkum að því er varðar óhreinindi, eðlisástand efnisins og eðlislæga eiginleika þess (ef þekkt er) sem haft gætu áhrif á niðurstöðurnar.

Greina verður frá notkun á kvikasilfursúlfati til að lágmarka truflun af völdum klóríðs.

4. HEIMILDIR

1) Kelkenberg, H.,Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13,169.

Skrá yfir staðlaðar aðferðir, t.d.:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. NIÐURBROT — NIÐURBROT ÁN TILSTILLIS LÍFVERA: VATNSROF SEM FALL AF SÝRUSTIGI

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð jafngildir OECD-viðmiðunarreglu 111 um prófanir (2004).

1.1. INNGANGUR

Komuleiðir íðefna í yfirborðsvatn geta t.d. verið bein ísetning, úði, afrennsli, framræsla, förgun úrgangs, frárennsli frá iðnaði, heimilum eða landbúnaði og ákoma úr andrúmsloftinu og efnin geta umbreyst í vatninu með efnafræðilegum ferlum (t.d. vatnsrofi, oxun), ljósefnafræðilegum og/eða örverufræðilegum ferlum. Þessar viðmiðunarreglur lýsa prófunaraðferð á rannsóknarstofu fyrir mat á umbreytingu efna í vatnskerfum með vatnsrofi án tilstillis lífvera, við pH-gildi sem eru algeng í umhverfinu (pH-gildi 4–9), og eru byggðar á núverandi leiðbeiningum (1.–7. heimild).

Tilraunirnar eru gerðar til að ákvarða: i. vatnsrofshraða prófunarefnisins sem fall af sýrustigi og ii. einkenni eða eðli vatnsrofsafurða sem lífverur geta orðið fyrir váhrifum af og hraða myndunar þeirra og rýrnunar. Slíkar rannsóknir geta verið nauðsynlegar vegna íðefna sem eru sett beint í vatn eða sem er líklegt að berist út í umhverfið eftir hinum leiðunum sem lýst var hér að framan.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Sjá 2. viðbæti

1.3. NOTKUNARSVIÐ AÐFERÐARINNAR

Þessi prófun er almennt notuð fyrir efni (ómerkt eða geislamerkt) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Hana er hægt að nota fyrir lítillega rokgjörn og órokgjörn efnasambönd með nægilega vatnsleysni. Prófunina skal ekki gera á íðefnum sem rjúka mjög úr vatni (t.d. svæliefnum og lífrænum leysum) og er því erfitt að halda í lausn við tilraunaskilyrðin í þessari prófun. Prófunina getur verið erfitt að framkvæma með efnum með lágmarksvatnsleysni.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Dauðhreinsaðar vatnslausnir með jafna sem hafa mismunandi pH-gildi (pH-gildi 4, 7 og 9) eru meðhöndlaðar með prófunarefninu og látnar standa í myrkri við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu (við stöðugt hitastig). Eftir hæfilegan tíma eru jafnalausnirnar greindar með tilliti til prófunarefnisins og vatnsrofsafurða. Auðveldara er að ná massajafnvægi með merktu prófunarefni (t.d. ^{14}C).

Þessi prófunaraðferð er hönnuð sem stigskipt aðferð, sem er sýnd og útskýrð í 1. viðbæti. Hvert stig leiðir af niðurstöðum fyrra stigs.

1.5. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Nota má hvort sem er ómerkt eða merkt prófunarefni til að mæla vatnsrofshraðann. Almennt er æskilegt að nota merkt efni fyrir rannsóknir á ferli vatnsrofs og til að fastsetja massajafnvægi; í sérstökum tilvikum getur þó verið að merking sé ekki algerlega nauðsynleg. Mælt er með ^{14}C-merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ^{13}C, ^{15}N og ^{3}H. Merkta efnið skal, ef unnt er, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar (1. heimild). Ef prófunarefnið inniheldur t.d. einn hring þarf að merkja þann hring; ef prófunarefnið inniheldur tvo eða fleiri hringi getur sérstök rannsókn verið nauðsynleg til að meta hvað verður um hvern merktan hring og til að fá nægar upplýsingar um myndun vatnsrofsafurða. Hreinleiki prófunarefnisins skal vera a.m.k. 95%.

Áður en vatnsrofsprófun er gerð skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

a) vatnsleysni (prófunaraðferð A.6),

b) leysni í lífrænum leysum,

c) gufuþrýstingur (prófunaraðferð A.4) og/eða fasti samkvæmt lögmáli Henrys,

d) deilistuðull n-oktanóls/vatns (prófunaraðferð A.8),

e) klofnunarstuðull (pKa) (OECD-leiðbeiningar 112) (9. heimild),

f) hraði beinnar og óbeinnar ljósummyndunar í vatni þar sem við á.

Greiningaraðferðir til að magnákvarða prófunarefnið, og ef við á til að greina og magngreina vatnsrofsafurðir í vatnslausnum, skulu vera fyrirliggjandi (sjá einnig lið 1.7.2).

1.6. VIÐMIÐUNAREFNI

Þar sem mögulegt er skulu viðmiðunarefni notuð til greiningar og magngreiningar á vatnsrofsafurðum með aðferðum þar sem litrófsgreining og litskiljun eru notaðar eða öðrum viðeigandi nákvæmum aðferðum.

1.7. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.7.1. **Endurheimt**

Greining á minnst tveimur eins jafnalausnum eða á útdráttum þeirra, um leið og prófunarefninu hefur verið bætt við, gefur fyrstu vísbendingu um endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar og samræmi aðferðarinnar sem notuð er við ísetningu prófunarefnisins. Endurheimt fyrir síðari stig tilraunanna sjást af viðkomandi massajafnvægi (þegar merkt efni er notað). Endurheimtur skulu vera á bilinu 90% til 110% fyrir merkt og ómerkt efni (7. heimild), Þegar tæknilega erfitt er að ná þessu sviði eru endurheimtur upp á 70% fyrir ómerkt íðefni ásættanlegar en lagður skal fram rökstuðningur fyrir því.

1.7.2. **Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar**

Hægt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferða, sem notaðar eru til að magngreina prófunarefnið og vatnsrofsafurðirnar síðar, með greiningu á tveimur eins jafnalausnunum (eða á útdrætti þeirra) eftir að nægilegt magn vatnsrofsafurða hefur myndast til að hægt sé að magngreina þær.

Greiningaraðferðin skal vera nægilega næm til að magngreina prófunarefni í styrk sem er 10% eða minna af upphafsstyrk. Ef við á skulu greiningaraðferðir einnig vera nægilega næmar til að magngreina hvers konar vatnsrofsafurðir sem eru 10% eða meira af ísettu efni (allan tímann meðan á rannsókninni stendur) eða 25% eða minna af hámarksstyrk þess.

1.7.3. **Öryggisbil fyrir hvarfafræðileg gögn um vatnsrof**

Reikna skal út og setja fram öryggisbil fyrir alla aðhvarfsstuðla, hraðastuðla, helmingunartíma og alla aðra hvarfafræðilega mæliþætti (t.d. DT_{50}).

1.8. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.8.1. **Búnaður og tæki**

Rannsóknina skal framkvæma í glerílátum (t.d. tilraunaglösum, litlum flöskum), í myrkri og við dauðhreinsaðar aðstæður ef nauðsyn krefur, nema fyrirliggjandi upplýsingar (s.s. deilistuðull n-oktanóls og vatns) bendi til að prófunarefnið geti loðað við gler. Í slíkum tilvikum getur þurft að taka til athugunar staðgönguefni (s.s. teflon). Einnig getur verið mögulegt að bæta úr vandamálinu vegna viðloðunar við gler með því að nota eina eða fleiri af eftirfarandi aðferðum:

— ákvarða þann massa prófunarefnisins og vatnsrofsafurða sem ásogast á prófunarílátið,

— nota úthljóðsbað,

— tryggja að öll glervara sé skoluð með leysi við hverja sýnatöku,

— nota samsettar vörur,

— að nota meira magn af meðleysi við ísetningu prófunarefnisins í kerfið en ef meðleysir er notaður má hann ekki vera þeirrar gerðar að hann hvarfist við prófunarefnið.

Til að láta hinar mismunandi prófunarlausnir standa við tiltekin skilyrði þarf venjulega hitastýrt vatnsbað með hristibúnaði eða hitakassa með hitastillingu.

Nota þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:

— sýrustigsmælir,

— greiningartæki, s.s. búnaður til gaslitskiljunar (GLC), háþrýstivökvaskiljunar (HPLC) og þunnlagsskiljunar (TLC), þ.m.t. viðeigandi kerfi til að greina geislamerkt og ómerkt efni, eða aðferð með umsnúinni samsætuþynningu,

— tæki til sanngreiningar (t.d. til massagreininga (MS), gas- og massagreininga (GC-MS), háþrýstivökvaskiljunar og massagreininga (HPLC-MS), segulómunar (NMR) o.s.frv.,

— vökvasindurteljari,

— skiltrektir fyrir útdrátt vökva úr vökva,

— tækjabúnaður til að þykkja lausnir og útdregna vökva (t.d. hverfieimir),

— hitastýring (t.d. vatnsbað).

Efnafræðileg prófefni eru t.d.:

— lífrænir leysar af greiningarhreinleika, s.s. hexan, díklórmetan, o.s.frv.,

— sindurteljaravökvi,

— jafnalausnir (sjá nánar í lið 1.8.3).

Dauðhreinsa skal alla glervöru, vatn af prófefnahreinleika og jafnalausnir, sem notaðar eru í vatnsrofsprófunum.

1.8.2. **Ísetning prófunarefnis**

Prófunarefnið skal setja í hinar mismunandi jafnalausnir í vatnslausn (sjá 3. viðbæti). Heimilt að nota lítið magn af vatnsblandanlegum leysum (s.s. asetónítríl, aseton, etanól) til ísetningar og dreifingar á prófunarefninu ef það er nauðsynlegt til að uppleysing verði nægileg en þeir ættu að öllu jöfnu ekki að fara yfir 1% af rúmmáli. Ef talin er þörf á hærri styrk af leysum (t.d. ef prófunarefnið er torleysanlegt) er aðeins heimilt að nota hann ef hægt er að sýna fram á að leysirinn hafi engin áhrif á vatnsrof prófunarefnisins.

Venjulega er ekki mælt með notkun samsettra vara þar sem ekki er hægt að útiloka að samsetningarefnin hafi áhrif á vatnsrofsferlið. Ef prófunarefnin eru torleyst í vatni, eða ef efnin loða við gler (sjá lið 1.8.1), geta þó samsett efni verið heppilegur valkostur.

Nota skal einn styrk af prófunarefninu; hann skal ekki vera yfir 0,01 M eða helmingurinn af mettunarstyrknum (sjá 1. viðbæti).

1.8.3. **Jafnalausnir**

Framkvæma skal vatnsrofsprófunina við pH-gildi 4, 7 og 9. Í þessu skyni skal tilreiða jafnalausnir úr íðefnum af prófefnahreinleika og vatni. Nokkur gagnleg jafnakerfi eru sett fram í 3. viðbæti. Tekið skal fram að jafnakerfið sem notað er getur haft áhrif á hraða vatnsrofs og að þar sem það kemur fram skal nota annað jafnakerfi ([1]).

([1]) Mabey og Mill mæla með notkun bórat- eða asetatjafna í stað fosfatjafna (11. heimild).

Yfirfara skal sýrustig hverrar jafnalausnar með kvörðuðum sýrustigsmæli með nákvæmni upp á minnst 0,1 við hitastigið sem nauðsynlegt er.

1.8.4. **Prófunarskilyrði**

1.8.4.1. *Prófunarhitastig*

Vatnsrofstilraunirnar skal framkvæma við stöðug hitastig. Vegna framreiknings er mikilvægt að halda hitastiginu a.m.k. innan við ± 0,5 °C.

Gera skal forprófun (1. stig) við 50 °C ef vatnsrofshegðun prófunarefnisins er óþekkt. Hraðafræðilegar prófanir á efri stigum skal framkvæma við þrjú hitastig að lágmarki (að prófuninni við 50 °C meðtaldri) nema komið hafi í ljós við prófunina á 1. stigi að prófunarefnið sé stöðugt að því er varðar vatnsrof. Ráðlagt hitasvið er 10–70 °C (æskilegt er að hafa minnst eitt hitastig undir 25 °C), sem nær þá yfir 25 °C hitastigið sem skrá skal og flest hitastigin sem fyrir koma á vettvangi.

1.8.4.2. *Ljós og súrefni*

Allar vatnsrofsprófanirnar skal framkvæma með aðferðum sem henta til að forðast áhrif ljósrofs. Gera skal allar viðeigandi ráðstafanir til að forðast súrefni (t.d. með helíum-, köfnunarefnis eða argonstreymi í fimm mínútur áður en lausnin er tilreidd).

1.8.4.3. *Lengd prófunar*

Forprófunin skal standa í 5 daga en prófunum á efri stigum skal halda áfram þar til vatnsrof prófunarefnisins hefur náð 90%, þó ekki lengur en í 30 daga.

1.8.5. **Framkvæmd prófunarinnar**

1.8.5.1. *Forprófun (1. stig)*

Forprófunin er framkvæmd við 50 ± 0,5 °C og pH-gildi 4,0, 7,0 og 9,0. Ef vatnsrof er minna en 10% eftir 5 daga ($t_{0,5}$ 25 °C > 1 ár) telst prófunarefnið stöðugt að því er varðar vatnsrof og frekari prófanir eru venjulega ónauðsynlegar. Ef vitað er að efnið er óstöðugt við viðkomandi umhverfishitastig ([1]) er forprófunin ekki nauðsynleg. Greiningaraðferðin verður að vera nægilega nákvæm og næm til að greina lækkun sem nemur 10 % af upphafsstyrk.

1.8.5.2. *Vatnsrof óstöðugra efna (2. stig)*

Efri stigs prófunin (lengra komin) skal framkvæmd við þau sýrustigsgildi sem efnin voru óstöðug við í forprófuninni hér að ofan. Jafnalausnir prófunarefnisins skulu vera hitastilltar við þau hitastig sem valin eru. Til að prófa fyrir fyrstu gráðu hegðun skal greina hverja hvarflausn með millibilum sem gefa minnst sex gagnapunkta sem dreifast venjulega milli 10% og 90% vatnsrofs prófunarefnisins. Taka skal einstök sýni til samhliða prófana (að lágmarki tvö eins sýni úr sitt hvoru hvarfílátinu) og greina innihaldið á hverjum af minnst sex sýnatökutímum (til að fá að lágmarki tólf gagnapunkta úr samhliða prófunum). Litið er svo á að notkun staks stórsýnis (e. *bulk sample*), sem einstakir deiliskammtar eru teknir úr við hverja sýnatöku, sé ófullnægjandi þar sem slíkt gerir ókleift að greina gagnabreytileika og getur leitt til vandamála vegna mengunar prófunarlausnarinnar. Framkvæma skal prófanir til að staðfesta dauðhreinsun við lok efra stigs prófunarinnar (þ.e. við 90% vatnsrof eða eftir 30 daga). Ef ekkert niðurbrot (þ.e. umbreyting) kemur fram eru dauðhreinsunarprófanir þó ekki taldar nauðsynlegar.

1.8.5.3. *Sanngreining vatnsrofsafurða (3. stig)*

Sanngreina skal allar helstu vatnsrofsafurðir, a.m.k. þær sem eru > 10% af skammtinum sem var notaður, með viðeigandi greiningaraðferðum.

1.8.5.4. *Valfrjálsar prófanir*

Viðbótarprófanir við önnur pH-gildi en 4, 7 og 9 geta verið nauðsynlegar vegna prófunarefna sem eru óstöðug að því er varðar vatnsrof. Af líffræðilegum ástæðum getur t.d. verið þörf á prófun við súrari aðstæður (t.d. pH-gildi 1,2) við eitt hitastig sem er líffræðilega markvert (37 °C).

([1]) Slíkar upplýsingar geta verið af öðrum uppruna, s.s. vatnsrofsgögn fyrir efnasambönd með svipaða byggingu úr heimildum eða úr öðrum hálfmegindlegum undirbúningsprófunum á vatnsrofi með prófunarefninu á fyrra þróunarstigi.

2. **GÖGN**

Magn prófunarefnis, og vatnsrofsafurða, ef þær skipta máli, skal gefið upp sem % af upphafsstyrknum sem var notaður og, ef við á, sem mg/l fyrir hvert bil milli sýnataka og fyrir hvert sýrustig og prófunarhitastig. Þegar notað er merkt prófunarefni skal að auki gefa massajafnvægi upp sem hundraðshluta af notaða upphafsstyrknum.

Sýna skal log-umbreytt gögn um styrkleika prófunarefnisins á móti tíma með myndrænni útfærslu. Sanngreina skal allar helstu vatnsrofsafurðir, a.m.k. þær sem standa fyrir ≥ 10% af íbættum skammti, og log-umbreytta styrkleika þeirra skal einnig teikna upp á sama hátt og upprunaefnið til að sýna hraða myndunar þeirra og niðurbrots.

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Nákvæmari ákvarðanir á helmingunartíma eða DT_{50}-gildum skulu gerðar með því að nota viðeigandi útreikninga með hraðafræðilegum reiknilíkönum. Greina skal frá helmingunartíma og/eða DT_{50} gildum (með öryggismörkum) fyrir hvert sýrustig og hitastig ásamt lýsingu á líkaninu sem notað er, hraðafræðilegri gráðu og ákvörðunarstuðli. Ef við á skal einnig beita útreikningunum á vatnsrofs-afurðirnar.

Ef um er að ræða rannsóknir á hraða sem framkvæmdar eru við mismunandi hitastig skal lýsa hraðastuðlum vatnsrofs af sýndarfyrstu gráðu (k_{obs}) sem falli af hitastigi. Útreikninginn skal bæði byggja á skiptingu hraðastuðla (k_{obs}) í stuðla fyrir sýruhvatað, hlutlaust og basahvatað vatnsrof (k_H, $k_{hlutlaus}$ og k_{OH}, í þessari röð) og á Arrheniusarjöfnunni:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{hlutlaus} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i\,=\,H,hlutlaus,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

þar sem A_i og B_i eru aðhvarfsstuðlar fengnir með skurðpunkti, sá fyrri, og hallatölu, sá síðari, bestu aðhvarfslínu ln k_i á móti umhverfu algilds hitastigs á kelvin (T). Með því að nota Arrheniusarvenslin fyrir sýruhvatað, hlutlaust og basahvatað vatnsrof er hægt að reikna út stuðla vatnsrofshraða af sýndarfyrstu gráðu og þannig helmingunartíma fyrir önnur hitastig sem ekki er raunhæft að ákvarða hraðastuðul fyrir með beinni tilraun.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Flest vatnsrofshvörf fylgja sýndarfyrstu gráðu hvarfhraða og þess vegna eru helmingunartímar óháðir styrknum (sjá 4. jöfnu í 2. viðbæti). Þetta gerir venjulega kleift að beita rannsóknarstofuniðurstöðum sem fást við 10^{-2} til 10^{-3} M á umhverfisaðstæður ($\leq 10^{-6}$ M) (10. heimild). Mabey og Mill (11. heimild) greindu frá mörgum dæmum um góða fylgni milli hraða á vatnsrofi mældu í bæði hreinu og náttúrulegu vatni fyrir ýmis íðefni, að því tilskildu að bæði sýrustig og hitastig hafi verið mælt.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Í prófunarskýrslunni skulu a.m.k. vera eftirtaldar upplýsingar:

Prófunarefni:

— almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla (þ.m.t. staðsetning merkis eða merkja ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli (sjá lið 1.5);

— hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,

— geislaefnafræðilegur hreinleiki merkts íðefnis og mólvirkni (ef við á).

— Jafnalausnir:

— dagsetningar og upplýsingar um tilreiðslu,

— jafnalausnir og vatn sem notað er,

— mólstyrkur og sýrustig jafnalausna.

Prófunarskilyrði:

— dagsetningar rannsókna,

— ísett magn prófunarefnis,

— aðferð og leysar (gerð og magn) sem notaðir eru við ísetningu prófunarefnisins,

— rúmmál jafnaðra prófunarefnalausna sem eru látnar standa við tiltekin skilyrði,

— lýsing á kerfinu sem er notað til að ná fram þeim skilyrðum,

— sýrustig og hitastig meðan á rannsókninni stendur,

— sýnatökutímar,

— aðferð, eða aðferðir, við útdrátt,

— aðferðir við magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnisins og vatnsrofsafurða þess í jafnalausnunum,

— fjöldi samhliða prófana.

Niðurstöður:

— endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðanna sem eru notaðar,

— endurheimtur (gildi í % fyrir gilda rannsókn eru gefin upp í lið 1.7.1),

— gögn og meðaltöl úr samhliða prófunum, sett fram í töflu,

— massajafnvægi meðan á rannsóknunum stendur og við lok þeirra (þegar merkt prófunarefni er notað),

— niðurstöður forprófana,

— umræða og túlkun niðurstaðna,

— öll upprunaleg gögn og myndir.

Eftirfarandi upplýsingar þarf aðeins þegar vatnsrofshraði er ákvarðaður:

— línurit sem sýnir styrk prófunarefnisins á móti tíma og, eftir því sem við á, fyrir vatnsrofsafurðirnar við hvert sýrustig og hitastig;

— töflur yfir niðurstöður Arrheniusarjöfnu fyrir hitastigið 20 °C/25 °C, með sýrustigi, hraðastuðli (h^{-1} eða $dagur^{-1}$), helmingunartíma eða DT_{50}, hitastigum (°C) þ.m.t. öryggismörk og reiknistuðlar fyrir fylgni (r^2) eða sambærilegar upplýsingar;

— tillagður ferill vatnsrofs.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, (1981) Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 111, adopted 12 May 1981.

2) US-Environmental Protection Agency, (1982) 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 oC. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

3) Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

4) Evrópusambandið (ESB), (1995) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 95/36/EB frá 14. júlí 1995 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE um markaðssetningu plöntuvarnarefna. V. viðauki: Afdrif og hegðun í umhverfinu.

5) Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1991) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

6) BBA, (1980) Merkblatt No 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

7) SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

8) OECD, (2000) Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No 23.

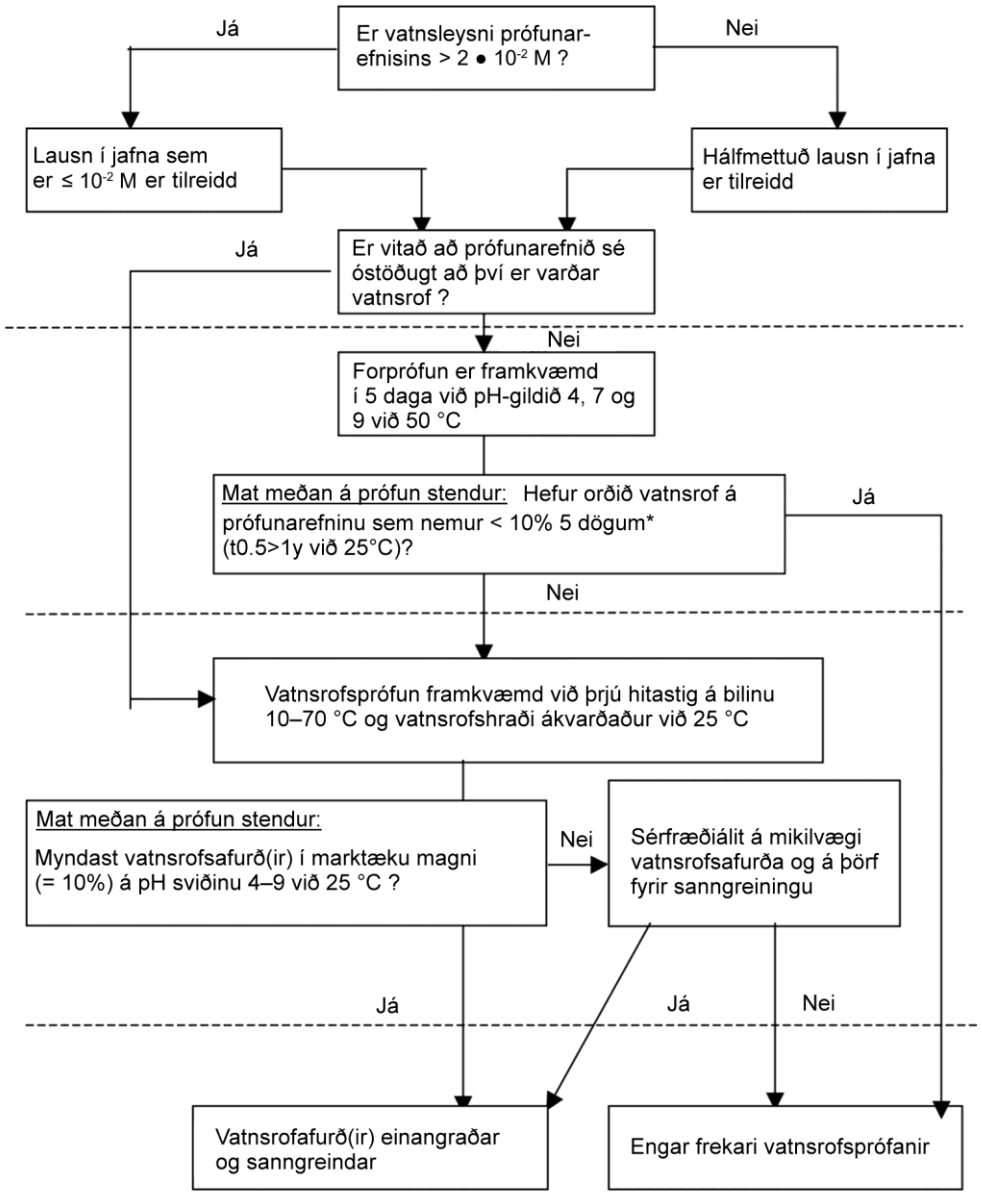
9) OECD, (1993) Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P., (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

11) Mabey, W. and Mill, T., (1978) Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, bls. 383-415.

1. viðbætir

Stigskipt prófunaráætlun fyrir vatnsrof



* 10% vatnsrof á prófunarefni við 50 °C samsvarar u.þ.b. 30 daga helmingunartíma, sem samsvarar gildi upp á u.þ.b. 1 ár við 20 °C.

2. viðbætir

Skilgreiningar og einingar

Í öllum tilvikum skal nota staðlaðar, alþjóðlegar einingar (SI-einingar).

Prófunarefni: hvaða efni sem er, hvort sem það er upprunaefnasambandið eða ummyndunarefni sem máli skipta.

Ummyndunarefni: öll efni sem myndast við ummyndunarhvörf prófunarefnisins sem verða fyrir tilstilli lífvera eða án þeirra.

Vatnsrofsafurðir: öll efni sem myndast við ummyndunarhvörf við vatnsrof prófunarefnisins.

Vatnsrof vísar til hvarfs prófunarefnis RX við vatn, þar sem X-hópnum er skipt út fyrir OH á hvarfsetinu (e. *reaction center*).

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Hraði minnkunar á styrk RX í þessu einfaldaða ferli fæst með

hraði = $k\,(H_2O)\,(RX)$ annarrar gráðu hvarf

eða

hraði = $k\,(RX)$ fyrstu gráðu hvarf

með hliðsjón af hraðaákvarðandi þrepi. Þar sem vatn er til staðar í miklu umframmagni miðað við prófunarefnið er þessari hvarfgerð venjulega lýst sem sýndarfyrstu gráðu hvarfi þar sem mældur hraðastuðull fæst með venslunum

$$k_{obs} = k\,(H_2O) \qquad [2]$$

og hann er hægt að ákvarða út frá stæðunni (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

þar sem:

t = tími

og C_o, C_t = styrkir RX á tímum 0 og t.

Einingar stuðulsins hafa mælieininguna $(\text{tími})^{-1}$ og helmingunartími hvarfsins (tíminn sem tekur 5 % af RX að hvarfast) er gefinn með

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Helmingunartími: ($t_{0,5}$) er sá tími sem 50% vatnsrof prófunarefnis tekur þegar hægt er að lýsa hvarfinu með hraðafræði af fyrstu gráðu; hann er óháður styrknum.

DT_{50} (sundrunartími 50): er tíminn meðan styrkur prófunarefnisins minnkar um 50%; ef hvarfið fylgir ekki hraðafræði af fyrstu gráðu er hann er ekki sá sami og helmingunartíminn $t_{0,5}$.

(*) Ef línurit log-umbreyttra gagna á móti tíma sýnir ekki línulegt fall (sem jafngildir fyrstu gráðu hvarfhraða), hentar ekki að nota 3. jöfnu til að ákvarða hraðastuðul vatnsrofs prófunarefnasambandsins.

Mat á k við mismunandi hitastig

Ef hraðastuðlar fyrir tvö hitastig eru þekktir er hægt að reikna út hraðastuðlana við önnur hitastig með því að nota Arrheniusarjöfnuna:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \qquad \text{eða} \qquad \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Línurit fyrir ln k á móti 1/T gefur beina línu með hallatölu -E/R

með:

k = hraðastuðull, mældur við mismunandi hitastig

E = virkjunarorka (kJ/mól)

T = algilt hitastig (K)

R = gasstuðull (8,314 J/mol.K)

Virkjunarorkan er reiknuð með aðhvarfsgreiningu eða eftirfarandi jöfnu:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

þar sem: $T_2 > T_1$.

3. viðbætir

Jafnakerfi

A. **CLARK OG LUBS:**

Jafnalausnir CLARKS og LUBS (*)

Samsetning	pH-gildi
0,2 N HCl og 0,2 N KCl við 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl þynnt upp í 100 ml	2,2
0,1 M kalíumbíþalat +0,1 N HCl við 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml bíþalat í 100 ml	3,8
0,1 M kalíumbíþalat +0,1 N NaOH við 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	4,8

(*) Sýrustigin sem gefin eru í þessum töflum hafa verið reiknuð út frá mælingum á mætti með staðaljöfnum Sörensens (1909). Samsvarandi pH-gildi eru 0,04 einingum hærri en töflugildin.

Samsetning	pH-gildi
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bíþalat í 100 ml	6,0

Jafnalausnir CLARKS og LUBS (framhald)

0,1 M mónókalíumfosfat +0,1 N NaOH við 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfat í 100 ml	8,0
0,1 M H3B03 í 0,1 M KCl +0,1 N NaOH við 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	9,2

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml bórsýra í 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF OG VLEESCHHOUWER:**

Sítratjafnalausnir KOLTHOFFS og VLEESCHHOUWERS

Samsetning	pH-gildi
0,1 M mónókalíumsítrat og 0,1 N HCl við 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml sítrat í 100 ml	3,6
0,1 M mónókalíumsítrat og 0,1 N NaOH við 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	5,4
68,0 ml. 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml sítrat í 100 ml	6,0

(*) Bætið við örlitlum kristal af þýmóli eða svipuðu efni til að hindra mygluvöxt.

C. **SÖRENSEN:**

Bórat blöndur SÖRENSENS

Samsetning		Sörensen 18 °C	Walbum, pH-gildi við		
ml Bórax	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M bórax +0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
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
0,05 M bórax +0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Fosfat blöndur SÖRENSENS

Samsetning	pH-gildi
0,0667 M mónókalíumfosfat + 0,0667 M dínatríumfosfat við 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6
53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8

41,3 ml KH2PO4 + 58,7 ml Na2HPO4	7,0
29,6 ml KH2PO4 + 70,4 ml Na2HPO4	7,2
19,7 ml KH2PO4 + 80,3 ml Na2HPO4	7,4
12,8 ml KH2PO4 + 87,2 ml Na2HPO4	7,6
7,4 ml KH2PO4 + 92,6 ml Na2HPO4	7,8
3,7 ml KH2PO4 + 96,3 ml Na2HPO4	8,0

C.8. EITURHRIF Á ÁNAMAÐKA

PRÓFUN Í TILBÚNUM JARÐVEGI

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Í þessari prófun á rannsóknarstofu er prófunarefninu bætt í tilbúinn jarðveg þar sem möðkum er komið fyrir í 14 daga. Eftir þetta tímabil (og valkvætt eftir 7 daga) eru banvæn áhrif efnisins á ánamaðkana skoðuð. Prófunin er aðferð til að skima, á tiltölulega stuttum tíma, áhrif efna á ánamaðka, við upptöku gegnum húð og í meltingarveg.

1.2. SKILGREINING OG EINING

LC_{50}: styrkur efnis sem metið er að drepi 50% af tilraunadýrunum á prófunartímabilinu.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni er notað reglubundið til að sýna fram á að næmi prófunarkerfisins hafi ekki tekið umtalsverðum breytingum.

Mælt er með klórasetamíði af greiningarhreinleika sem viðmiðunarefni.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Jarðvegur er breytilegur miðill þannig að fyrir þessa prófun er notaður nákvæmlega skilgreindur tilbúinn myldinn jarðvegur. Fullvaxnir ánamaðkar af tegundinni *Eisenia foetida* (sjá athugasemd í viðbæti) eru hafðir í skilgreindum tilbúnum jarðvegi, sem meðhöndlaður hefur verið með mismunandi styrkleikum af prófunarefninu. Innihaldi ílátanna er dreift á bakka 14 dögum (og valkvætt sjö dögum) eftir að prófunin hefst og þeir ánamaðkar sem hafa lifað af við hvern styrk taldir.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Prófunin er hönnuð fyrir eins mikla samanburðarnákvæmni og mögulegt er að því er varðar prófunarundirlag og lífveru. Dánartíðni í samanburðarhópunum má ekki vera yfir 10% við lok prófunar eða prófunin er ógild.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Efni*

1.6.1.1. Prófunarundirlag

Skilgreindur tilbúinn jarðvegur er notaður sem grunnundirlag fyrir prófunina.

a) Grunnundirstöðuefni (hundraðshlutar eru af þurrvigt)

— 10% mosamór (eins nærri pH-gildinu 5,5 til 6,0 og mögulegt er, án sýnilegra plöntuleifa og fínt mulinn),

— 20% kaólínít leir, helst með meira en 50% kaólíníti,

— u.þ.b. 69% iðnaðarkvarssandur (að miklu leyti fínn sandur þar sem yfir 50% sandkornanna eru 0,05–0,2 mm að stærð). Ef efnið dreifist ekki nægilega vel í vatni skal geyma 10 g fyrir hvert prófunarílát til blöndunar við prófunarefnið síðar,

— u.þ.b. 1% kalsíumkarbónati ($CaCO_3$), möluðu í duft, efnafræðilega hreinu, er bætt í til að færa pH-gildið í 6,0 ± 0,5.

b) Prófunarundirlag

Prófunarundirlagið inniheldur grunnundirstöðuefnið, prófunarefnið og afjónað vatn.

Vatnsinnihald er u.þ.b. 25 til 42% af þurrvigt grunnundirstöðuefnisins. Vatnsinnihaldið í undirstöðuefninu er ákvarðað með þurrkun á sýni við 105 °C þar til þyngdin er stöðug. Lykilskilyrði er að tilbúna jarðveginn þarf að væta að því marki að í honum sé ekkert standandi vatn. Við blöndun skal þess gætt að dreifing prófunarefnisins og undirstöðuefnisins sé jöfn. Greina þarf frá því hvernig prófunarefninu er bætt í undirstöðuefnið.

c) Samanburðarundirstöðuefni

Samanburðarundirstöðuefni inniheldur grunnundirstöðuefnið og vatn. Ef viðbætt efni er notað skal viðbótarsamanburður innihalda sama magn af viðbætta efninu.

1.6.1.2. Prófunarílát

Glerílát sem taka u.þ.b. einn lítra (hæfilega lokað með plastloki), diskum eða plastfilmu með loftræstigötum) fyllt með blautu prófunar- eða samanburðarundirstöðuefni sem jafngildir 500 g þurrvigt af undirstöðuefni.

1.6.2. *Prófunarskilyrði*

Ílátin skal hafa í loftslagsklefa við 20 ± 2 °C hita og samfellda lýsingu. Ljósstyrkur skal vera 400 til 800 lúx.

Prófunartímabilið er 14 dagar, en dánartíðni er hægt að meta valkvætt 7 dögum eftir að prófunin hefst.

1.6.3. *Prófunaraðferð*

Prófunarstyrkleikar

Styrkleikar prófunarefnisins eru gefnir upp sem þyngd efnis á móti þurrvigt grunnundirstöðuefnisins (mg/kg).

Skammtastærðarprófun

Ákvarða má röð styrkleika, sem valda dánartíðni frá 0 til 100%, með skammtastærðaprófun til að fá upplýsingar um þá röð styrkleika sem nota á í endanlegu prófuninni.

Efnið skal prófa í eftirfarandi styrkleikum: 1000; 100; 10; 1; 0,1 mg efni/kíló af prófunarundirstöðuefni (þurrvigt).

Ef til stendur að gera endanlega heildarprófun getur ein prófunarlota á hvern styrk og ein fyrir ómeðhöndlaðan samanburð, hver með 10 ormum, nægt fyrir skammtastærðaprófunina.

Endanleg prófun

Niðurstöðurnar úr skammtastærðaprófuninni eru notaðar til að velja minnst fimm styrkleika í jafnhlutfallaröð sem ná eins nærri og mögulegt er yfir dánartíðni frá 0% til 100% og eru með fastan styrkmun, ekki hærri en 1,8.

Prófanir þar sem þessar styrkraðir eru notaðar skulu gera kleift að meta LC_{50} gildið og öryggismörk þess eins nákvæmlega og mögulegt er.

Í endanlegu prófuninni eru notaðar minnst fjórar prófunarlotur fyrir hvern styrk og fjórar ómeðhöndlaðar til samanburðar, hver með 10 ormum. Niðurstöðurnar úr þessum lotum úr samhliða prófunum eru gefnar upp sem meðaltal og staðalfrávik.

Þegar tveir samfallandi styrkleikar í hlutfallinu 1,8 gefa aðeins 0 og 100% dánartíðni, veita þessi tvö gildi fullnægjandi mælikvarða á það svið sem LC_{50} fellur innan.

Blanda af grunnundirstöðuefni og prófunarefni

Undirstöðuefnið fyrir prófunina skal, alltaf þegar mögulegt er, tilreitt án allra viðbótarefna annarra en vatns. Rétt áður en prófunin hefst er ýrulausn eða dreifilausn prófunarefnisins í afjónuðu vatni eða öðrum leysi blandað við grunnundirstöðuefni prófunarinnar eða úðað jafnt yfir það með fínum litskiljuúða eða svipuðum úða.

Ef prófunarefnið er óleysanlegt í vatni má leysa það í eins litlu magni og mögulegt er af hentugum lífrænum leysi (t.d. hexani, asetoni eða klóróformi).

Aðeins má nota efni sem gufa auðveldlega upp til að leysa upp, dreifa eða ýra prófunarefnið. Loftræsta þarf undirstöðuefnið fyrir prófunina fyrir notkun. Það magn af vatni sem gufar upp þarf að endurnýja. Samanburðurinn skal innihalda sama magn af öllum viðbættum efnum.

Ef ekki er hægt að leysa upp, dreifa eða ýra prófunarefnið í lífrænum leysum er 10 g blöndu úr fínt möluðum kvarssandi og því magni af prófunarefni, sem þarf fyrir meðhöndlun á 500 g þurrvigt af tilbúnum jarðvegi, blandað við 490 g þurrvigt af undirstöðuefni.

Fyrir hverja prófunarlotu er blautt prófunarundirstöðuefni, sem samsvarar 500 g þurrvigt, sett í hvert glerílát og 10 ánamaðkar, sem hafa verið aðlagaðir í 24 klst. í svipuðu, blautu grunnundirstöðuefni og síðan þvegnir snöggt og umfram vatn sogað í síupappír fyrir notkun, settir á yfirborð prófunarundirstöðuefnisins.

Ílátunum er lokað með götuðum plastlokum, diskum eða filmu til að hindra að undirstöðuefnið þorni og þau síðan höfð við prófunarskilyrðin í 14 daga.

Matið skal framkvæmt 14 dögum (og valkvætt sjö dögum) eftir að prófunin var sett af stað. Undirstöðuefninu er dreift á bakka úr gleri eða ryðfríu stáli. Ánamaðkarnir eru skoðaðir og fjöldi eftirlifandi ánamaðka ákvarðaður. Ánamaðkar teljast dauðir ef þeir bregðast ekki við varlegu líkamlegu áreiti á framendann.

Þegar athugun er gerð eftir sjö daga er ílátið fyllt aftur með undirstöðuefni og eftirlifandi ánamaðkar settir aftur á yfirborðið á sama prófunarundirstöðuefni.

1.6.4. *Prófunarlífverur*

Prófunarlífverur skulu vera fullvaxnir *Eisenia foetida* (sjá athugasemd í viðbæti) (minnst tveggja mánaða gamlir með gjörð), blautvigt 300 til 600 mg (sjá aðferð við undaneldi í viðbæti).

2. **GÖGN**

2.1. MEÐHÖNDLUN OG MAT Á NIÐURSTÖÐUM

Greint er frá styrkleikum efnisins sem prófað er með tilvísun til samsvarandi hundraðshluta dauðra ánamaðka.

Þegar gögnin eru fullnægjandi skal ákvarða LC_{50} gildið og öryggismörkin (p = 0,05) með staðalaðferðum (Litchfield og Wilcoxon, 1949, fyrir jafngilda aðferð). LC_{50} skal gefa upp sem mg af prófunarefni á hvert kíló af prófunarundirstöðuefni (þurrvigt).

Í þeim tilvikum sem halli styrkferilsins er of mikill til að hægt sé að reikna LC_{50}, nægir að áætla þetta gildi myndrænt.

Þegar tveir samfallandi styrkleikar í hlutfallinu 1,8 gefa aðeins 0 og 100% dánartíðni veita þessi tvö gildi fullnægjandi mælikvarða á það svið sem LC_{50} fellur innan.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— yfirlýsing um að prófunin hafi verið gerð í samræmi við framangreindar gæðaviðmiðanir,

— prófun sem gerð er (skammtastærðarprófun og/eða endanleg prófun),

— nákvæm lýsing á prófunarskilyrðunum eða yfirlýsing um að prófunin hafi verið gerð í samræmi við aðferðina; greina þarf frá öllum frávikum,

— nákvæm lýsing á því hvernig prófunarefninu var blandað saman við grunnundirstöðuefni prófunarinnar,

— upplýsingar um prófunarlífverur (tegund, aldur, meðalþyngd og minnsta og mesta þyngd, aðstæður við eldi og undaneldi, birgir),

— aðferð sem er notuð til að ákvarða LC_{50},

— prófunarniðurstöður, þ.m.t. öll notuð gögn,

— lýsing á einkennum sem koma fram eða breytingum á atferli prófunarlífvera,

— dánartíðni í samanburðarhópum,

— LC_{50} eða hæsti prófaði styrkur án dauða og lægsti prófaði styrkur með 100% dánartíðni, 14 dögum (og valkvætt sjö dögum) eftir að prófunin var sett af stað,

— teiknaður ferill styrks/svörunar,

— niðurstöður sem hafa fengist með viðmiðunarefninu, hvort heldur í tengslum við viðkomandi prófun eða frá fyrra gæðaeftirliti sem hefur verið innt af hendi.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81)30 final.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, bls. 331.

3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, bls. 671.

4) Litchfield, J. T. andWilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, bls. 99.

5) Commission of the European Communities, Development of a standardised laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Toxizitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

Viðbætir

Undaneldi og eldi ormanna fyrir prófun

Til að fjölga ormunum eru 30 til 50 fullvaxnir ormar settir í undaneldisbox með nýju undirstöðuefni og fjarlægðir eftir 14 daga. Þessi dýr má nota fyrir frekari fjölgunarlotur. Ánamaðkarnir sem skríða úr egghylkjum eru notaðir í prófanir þegar þeir eru fullvaxnir (við stöðluð skilyrði eftir tvo til þrjá mánuði).

Skilyrði við eldi og undaneldi

Loftslagsklefi:	hitastig 20 ± 2 °C, helst með samfelldri lýsingu (ljósstyrkur 400 til 800 lúx).
Undaneldisbox:	hentug grunn ílát, 10 til 20 lítrar að rúmmáli.
Undirstöðuefni:	*Eisenia foetida* má ala í ýmis konar húsdýraskít. Sem undaneldismiðil er mælt með að nota blöndu af 50% mó miðað við rúmmál og 50% kúa- eða hrossaskít. Miðillinn skal hafa pH-gildið u.þ.b 6 til 7 (stýrt með kalsíumkarbónati) og lága jónaleiðni (minna en 6 mmhos eða 0,5% saltstyrk). Undirstöðuefni skal vera rakt en ekki of blautt. Nota má aðrar árangursríkar aðferðir en þá sem lýst er hér að framan.

Athugasemd: Til eru tveir kynþættir af *Eisenia foetida*, sem sumir flokkunarfræðingar hafa aðskilið í tegundir (Bouche, 1972). Þær eru formfræðilega svipaðar en önnur, *Eisenia foetida foetida*, er venjulega með þverstrípur eða bönd á liðunum og hin, *Eisenia foetida andrei*, er án þeirra og með rauð litbrigði. Nota skal *Eisenia foetida andrei* þar sem mögulegt er. Nota má aðrar tegundir ef nauðsynleg aðferðafræði er fáanleg.

C.9. **LÍFNIÐURBROT**

ZAHN-WELLENS-PRÓFUN

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með aðferðinni er að meta mögulegan fullnaðarlífbrjótanleika vatnsleysanlegra, órokgjarnra lífrænna efna þegar þau komast í snertingu við hlutfallslega mikla þéttni örvera í kyrrstöðuprófun.

Eðlisefnafræðilegt ásog á svifagnirnar getur átt sér stað og taka verður tillit til þess þegar niðurstöðurnar eru túlkaðar (sjá lið 3.2).

Efnin sem ætlunin er að rannsaka eru notuð í styrkleikum sem samsvara gildum uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) á bilinu 50–400 mg/lítra eða gildum efnafræðilegrar súrefnisþarfar (COD) sem svara til 100–1000 mg/lítra. Þessir hlutfallslega háu styrkleikar hafa þann kost að auka áreiðanleika við greiningu. Eitruð efnasambönd geta seinkað eða hamlað niðurbrotsferlinu.

Í þessari aðferð er mælingin á styrk uppleysts, lífræns kolefnis eða efnafræðilegu súrefnisþarfarinnar notuð til að meta fullnaðarlífbrjótanleika prófunarefnisins.

Það getur gert kleift að meta frumlífniðurbrot efnisins (hvarf efnafræðilegrar byggingar upprunaefnisins) ef notuð er sértæk greiningaraðferð samhliða.

Aðferðina er aðeins hægt að nota fyrir þau lífrænu prófunarefni sem, við prófunarstyrk,:

— eru leysanleg í vatni við prófunarskilyrðin,

— hafa óverulegan gufuþrýsting við prófunarskilyrðin,

— hafa ekki hamlandi áhrif á bakteríur,

— ásogast aðeins í litlum mæli innan prófunarkerfisins,

— tapast ekki úr prófunarlausninni með froðumyndun.

Upplýsingar um innbyrðis hlutföll aðalefnisþátta prófunarefnisins koma að gagni við túlkun á niðurstöðunum sem fást, sérstaklega þegar um er að ræða lágar niðurstöður eða jaðarniðurstöður.

Æskilegt er að hafa upplýsingar um eiturhrif efnisins á örverur þegar túlka á lágar niðurstöður og velja viðeigandi prófunarstyrkleika.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Umfang niðurbrots sem hefur orðið við lok prófunarinnar er skráð sem „Lífbrjótanleiki í Zahn-Wellens-prófuninni“:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

þar sem:

DT = lífniðurbrot (%) á tíma T,

CA = gildi fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) (eða efnafræðilega súrefnisþörf (COD)) í prófunarblöndunni mæld þremur klukkustundum eftir að prófunin hófst (mg/l),

CT = gildi fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eða efnafræðilega súrefnisþörf (COD) í prófunarblöndunni á sýnatökutíma (mg/l),

CB = gildi fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eða efnafræðilega súrefnisþörf (COD) í blanksýninu á sýnatökutíma (mg/l),

CBA = gildi fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eða efnafræðilega súrefnisþörf (COD) í blanksýninu mælt þremur klukkustundum eftir að prófunin hófst (mg/l).

Umfang niðurbrots er námundað að næsta heila hundraðshluta.

Hundraðshluti niðurbrots er sett fram sem sá hundraðshluti uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða miðað við efnafræðilega súrefnisþörf (COD)) í prófunarefninu sem er fjarlægður.

Munurinn á gildinu sem mælist eftir þrjár klukkustundir og þess sem er reiknað út eða því sem æskilegast er, mælda upphafsgildinu, getur veitt gagnlegar upplýsingar um fjarlægingu efnisins (sjá lið 3.2, Túlkun niðurstaðna).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Þegar rannsökuð eru ný efni geta viðmiðunarefni í sumum tilvikum verið gagnleg; hins vegar er enn ekki hægt að mæla með sérstökum viðmiðunarefnum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Virk seyra, steinefni og prófunarefni í vatnslausn eru sett saman, sem einu kolefnisgjafarnir, í eins til fjögurra lítra glerílát sem búið er hræribúnaði og loftblandara. Blandan er hrærð og loftblönduð við 20 til 25 °C undir dreifðri lýsingu eða í dimmu herbergi í allt að 28 daga. Niðurbrotsferlið er vaktað daglega, eða með öðrum reglulegum og viðeigandi millibilum, með ákvörðun á gildum fyrir uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) (eða fyrir efnafræðilega súrefnisþörf (COD)) í síuðu lausninni. Hlutfall milli fjarlægingar uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða fjarlægingar miðað við efnafræðilega súrefnisþörf (COD)) eftir hvert tímabil á móti gildinu þremur klst. eftir upphafið er gefið upp sem hundraðshluti lífniðurbrots og er mælikvarði á umfang niðurbrots á þessum tíma. Niðurstöðurnar eru teiknaðar upp á móti tíma til að fá ferilinn fyrir lífniðurbrot.

Þegar notuð er sértæk greiningaraðferð er hægt að mæla breytingar á styrk móðursameindarinnar vegna lífniðurbrots (frumlífbrjótanleiki).

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Samanburðarnákvæmni þessarar prófunar hefur reynst fullnægjandi í hringprófun.

Næmi aðferðarinnar ákvarðast að miklu leyti af breytileika blanksýnisins og, í minni mæli, af nákvæmni ákvörðunarinnar á uppleystu, lífrænu kolefni og styrk prófunarefnasambandsins í vökvanum.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Efnablöndur*

1.6.1.1. Prófefni

Prófunarvatn: neysluvatn með lífrænt kolefnisinnihald < 5 mg/lítra. Styrkur kalsíum- og magnesíumjóna saman má ekki vera yfir 2,7 mmól/lítra; annars þarf að þynna nægilega með afjónuðu eða eimuðu vatni.

Brennisteinssýra, greiningarprófefni (A.R.):	50 g/l
Natríumhýdroxíðlausn, A.R.:	40 g/l
Steinefnanæringarlausn: leysið í einum lítra af afjónuðu vatni:	
ammóníumklóríð, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
natríumdíhýdrógenfosfat, $NaH^2PO^4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g
kalíumdíhýdrógenfosfat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
díkalíummónóhýdrógenfosfat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Blöndurnar þjóna bæði sem næringarefni og jafnakerfi.

1.6.1.2. Búnaður

Glerílát sem taka einn til fjóra lítra (t.d. sívöl ílát).

Hræribúnaður með hræripinna úr gleri eða málmi á viðeigandi ás (hræripinninn skal snúast um 5 til 10 cm fyrir ofan botn ílátsins). Hægt er að nota segulhrærara með 7 til 10 cm löngum teini í staðinn.

Glerpípa með 2 til 4 mm innra þvermáli til að leiða inn loft. Opið á pípunni skal vera um 1 cm yfir botni ílátsins.

Skilvinda (um 3550 g).

Sýrustigsmælir.

Mælir fyrir uppleyst súrefni.

Pappírssíur.

Himnusíunarbúnaður.

Himnusíur, opstærð 0,45 µm. Himnusíur henta ef tryggt er að þær hvorki losi kolefni né frásogi efnið í síunarþrepinu.

Greiningarbúnaður til að ákvarða innihald lífræns kolefnis og efnafræðilega súrefnisþörf.

1.6.1.3. Undirbúningur sáðsins

Virk seyra frá lífrænni hreinsistöð er þvegin með (endurtekinni) skiljun í skilvindu eða hún látin setjast með prófunarvatni (að ofan).

Virka seyran verður að vera í viðeigandi ástandi. Slík seyra er fáanleg frá skólphreinsistöð sem starfar á tilhlýðilegan hátt. Til að fá eins margar tegundir eða stofna af bakteríum og mögulegt er getur verið æskilegt að blanda sáði af mismunandi uppruna (t.d. frá mismunandi hreinsistöðvum, jarðvegsútdrætti, árvatni, o.s.frv.). Blandan er meðhöndluð eins og lýst er að ofan.

Sjá „Virknieftirlit“ hér neðar vegna athugunar á virkni virku seyrunnar.

1.6.1.4. Tilreiðsla prófunarlausnanna

Bætið 500 ml af prófunarvatni í prófunarílátið, 2,5 ml/lítrum af steinefnanæringarlausn og virkri seyru í magni sem samsvarar 0,2 til 1,0 g/lítra af þurrefni í lokablöndunni. Bætið við hæfilega miklu af stofnlausn af efninu sem ætlunin er að prófa til að styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) verði 50 til 400 mg/lítrar í lokablöndunni. Samsvarandi gildi fyrir efnafræðilega súrefnisþörf (COD) eru 100 til 1000 mg/lítra. Fyllið upp með prófunarvatni að heildarrúmmálinu einn til fjórir lítrar. Heildarrúmmálið sem velja skal er háð fjölda sýna sem á að taka fyrir ákvarðanir á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eða efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) og magninu sem nauðsynlegt er fyrir greiningarferlið.

Venjulega má líta á tvo lítra sem fullnægjandi magn. Setja skal upp minnst eitt samanburðarílát (blanksýni) til hliðstæðrar prófunar með hverri prófunarsyrpu; það inniheldur aðeins virka seyru og steinefnanæringarlausn og er fyllt upp með prófunarvatni að sama heildarrúmmáli og í prófunarílátunum.

1.6.2. *Framkvæmd prófunarinnar*

Hrært er í prófunarílátunum með segulhrærurum eða skrúfum undir dreifðri lýsingu eða í myrku herbergi við 20 til 25 °C. Loftað er með þrýstilofti sem er hreinsað með bómullarsíu og skolflösku ef nauðsyn krefur. Tryggja verður að seyran setjist ekki og að súrefnisstyrkurinn fari ekki undir 2 mg/lítra.

Kanna þarf pH-gildið með reglulegu millibili (t.d. daglega) og stilla í pH-gildið 7 til 8 ef þörf er á.

Bætt er fyrir tap vegna uppgufunar rétt fyrir hverja sýnatöku með afjónuðu eða eimuðu vatni í nauðsynlegu magni. Það er gott verklag að merkja vökvastöðuna á ílátið áður en prófunin hefst. Nýjar merkingar eru settar eftir hverja sýnatöku (án loftunar og án þess að hræra). Fyrstu sýnin eru alltaf tekin þremur klukkustundum eftir upphaf prófunarinnar til að greina hvort prófunarefnið ásogast á virku seyruna.

Eftir fjarlægingu prófunarefnisins er uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD) ákvörðuð daglega eða með öðru reglulegu millibili. Sýnin úr prófunarílátinu og blanksýninu eru síuð í

gegnum vandlega þvegna pappírssíu. Fyrstu 5 ml af síuvökva prófunarlausnarinnar er hent. Seyru sem erfitt er að sía má fjarlægja áður með skiljun í 10 mínútur. Ákvarðanir á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) og efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) eru gerðar með a.m.k. tveimur eins sýnum. Prófunin stendur yfir í allt að 28 daga.

Athugasemd: sýni sem eru áfram gruggug eru síuð í gegnum himnusíur. Himnusíurnar mega ekki losa eða ásoga neitt lífrænt efni.

Virknieftirlit með virkri seyru

Með hverri prófunarsyrpu skal gera hliðstæða prófun með íláti með þekktu efni til að fylgjast með starfrænni getu virku seyrunnar. Díetýlenglýkól hefur reynst gagnlegt til þessara nota.

Aðlögun

Ef greiningar eru gerðar með hlutfallslega stuttu millibili (t.d. daglega), er hægt að sjá skýran greinarmun á aðlögun og niðurbrotsferlinum (sjá mynd 2). Prófunina skal því ekki hefja rétt fyrir helgi.

Ef aðlögun á sér stað í lok tímabilsins er hægt að framlengja prófunina þar til niðurbroti er lokið.

Athugasemd: ef þörf er á víðtækari vitneskju um hegðun aðlöguðu seyrunnar er sama virka seyran aftur látin komast í snertingu við sama prófunarefnið með eftirfarandi tilhögun:

Slökkt er á hræribúnaðinum og loftblandaranum og virku seyrunni leyft að setjast. Dragið flotið af, fyllið upp að tveimur lítrum með prófunarvatni, hrærið í 15 mínútur og látið setjast á ný. Þegar búið er að draga flotið ofan af er seyran sem eftir er notuð til að endurtaka prófunina með sama efni í samræmi við 1.6.1.4 og 1.6.2 hér á undan. Einnig má einangra virku seyruna með skiljun í stað þess að láta hana setjast.

Aðlöguðu seyrunni má blanda við nýja seyru í styrknum 0,2 til 1 g þurrvigt/lítra.

Greiningaraðferðir

Venjulega eru sýni síuð í gegnum vandlega þvegna pappírssíu (notið afjónað vatn við þvottinn).

Sýni sem eru enn gruggug eru síuð í gegnum himnusíur (0,45 μm).

Styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) er ákvarðaður með tveimur eins sýnum af síuvökvanum (fyrstu 5 ml er hent) með mælitækinu fyrir heildarmagn lífræns kolefnis (TOC). Ef ekki er hægt að greina síuvökvann samdægurs, verður að geyma hann í kæli til næsta dags. Ekki er hægt að mæla með lengri geymslu.

Styrkur miðað við efnafræðilega súrefnisþörf (COD) er ákvarðaður í síuvökva sýnisins með greiningu á efnafræðilegri súrefnisþörf samkvæmt aðferðinni sem lýst er í 2 heimild hér fyrir neðan.

2. **GÖGN OG MAT**

Ákvarðanir á styrk uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) og/eða styrk sem svarar efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) í sýnunum eru gerðar með minnst tveimur eins sýnum samkvæmt 1.6.2 hér fyrir ofan. Niðurbrotið á tíma T er reiknað samkvæmt formúlunni (með skilgreiningum) sem gefin er undir 1.2 hér að ofan.

Umfang niðurbrots er námundað að næsta heila hundraðshluta. Umfang niðurbrots sem hefur orðið við lok prófunarinnar er skráð sem „Lífbrjótanleiki í Zahn-Wellens-prófuninni“:

Athugasemd: ef fullkomið niðurbrot næst áður en prófunartíminn er liðinn og þær niðurstöður eru staðfestar með annarri greiningu næsta dag, er komin niðurstaða úr prófuninni.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— upphafsstyrkur efnisins

— allar aðrar upplýsingar og tilraunaniðurstöður viðkomandi prófaða efninu, viðmiðunarefninu ef slíkt er notað og blanksýninu,

— styrkurinn eftir þrjár klukkustundir,

— lífniðurbrot: ferill ásamt lýsingu,

— dagsetning og staður þar sem prófunarlífverunum var safnað, staða aðlögunar, notaður styrkur, o.s.frv.,

— vísindalegur rökstuðningur fyrir öllum breytingum á prófunaraðferð.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Fjarlæging uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (efnafræðileg súrefnisþörf (COD)), sem verður smám saman á dögum eða vikum, sýnir lífniðurbrot prófunarefnisins.

Eðlisefnafræðilegt ásog getur hins vegar í sumum tilvikum haft áhrif og vísbending um það er að fullkomin fjarlæging eða fjarlæging að hluta til verður strax í upphafi, á fyrstu þremur klukkustundunum, og munurinn milli samanburðar- og prófunarflotsins helst lægri en búast má við.

Frekari prófanir eru nauðsynlegar ef gera á greinarmun á lífniðurbroti (eða lífniðurbroti að hluta til) og ásogi.

Það er hægt að gera á ýmsa vegu en mest sannfærandi er að nota flotið eða seyru sem sáð í prófun með grunnuppsetningu (helst öndunarprófun).

Líta skal á prófunarefni sem mögulega lífbrjótanleg ef þau sýna mikla fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) án ásogs í þessari prófun. Fjarlæging að hluta til, án ásogs, bendir til þess að efnið sé a.m.k. lífniðurbrjótanlegt að einhverju leyti. Lítil eða engin fjarlæging uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) getur stafað af því að prófunarefnið hefur hamlandi áhrif á örverurnar og þetta getur einnig komið fram sem sundrun og tap á seyru, sem hefur í för með sér gruggugt flot. Endurtaka skal prófunina með minni styrk prófunarefnisins.

Notkun greiningaraðferðar sem er sértæk fyrir efnasambandið eða ^{14}C-merkts prófunarefnis getur veitt meiri næmleika. Ef notað er ^{14}C prófunarefnasamband er það endurheimtin á $^{14}CO_2$ sem staðfestir að lífniðurbrot hafi átt sér stað.

Þegar niðurstöður eru settar fram sem frumlífniðurbrot skal, ef mögulegt er, gefa skýringu á þeirri breytingu á efnafræðilegri byggingu sem leiðir til þess að svörun upprunaprófunarefnisins tapast.

Gefa þarf upp fullgildingu greiningaraðferðarinnar ásamt svöruninni sem kom fram í blankprófunarmiðlinum.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, (OJ L 251,19.9.1984, bls. 1).

Viðbætir

DÆMI UM MAT

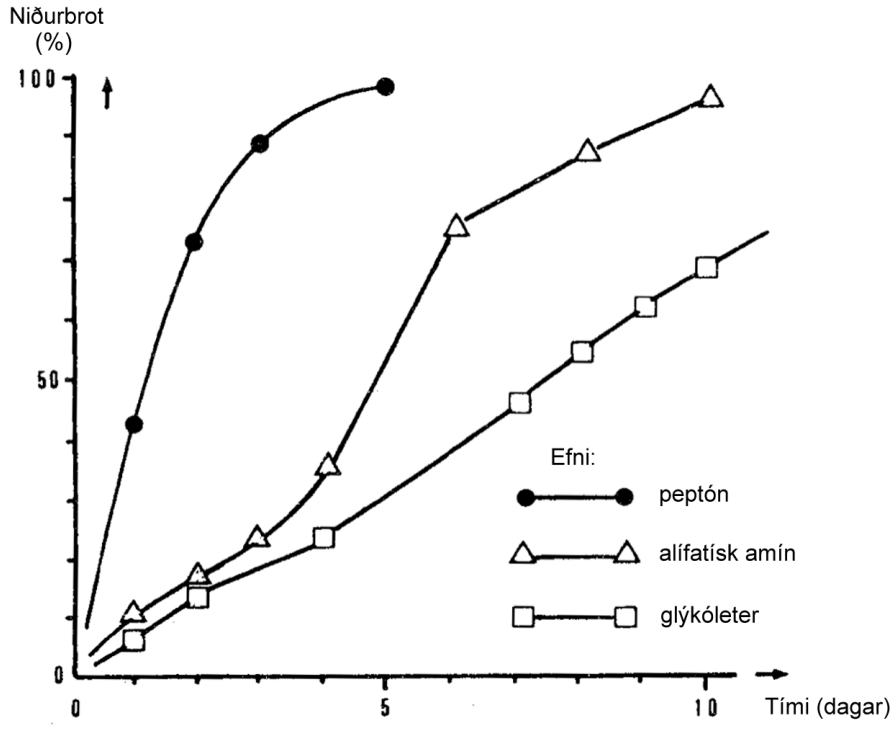
Lífrænt efnasamband:	4-etoxýbensósýra
Fræðilegur prófunarstyrkur:	600 mg/1
Fræðilegt uppleyst, lífrænt kolefni (DOC):	390 mg/l
Sáð	Skólphreinsistöð ...
Styrkleiki:	1 gram þurrefni/lítra
Staða aðlögunar:	ekki aðlagað
Greining:	Ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)
Sýnisstærð:	3 ml
Samanburðarefni:	Díetýlenglýkól
Eiturhrif efnis:	Engin eiturhrif undir 1000 mg/l Prófun sem notuð er: prófun í gerjunarglösum

Prófunartími	Samanburðarefni				Prófunarefni		
	Blanksýni (DOC) (1) mg/l	(DOC) (1) mg/l	(DOC) (1) mg/l	Niðurbrot %	(DOC) (1) mg/l	(DOC) (1) mg/l	Niðurbrot %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 klst.	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dagur	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dagar	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dagar	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dagar	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dagar	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dagar	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dagar	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dagar	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Meðalgildi þrítekinna ákvarðana.

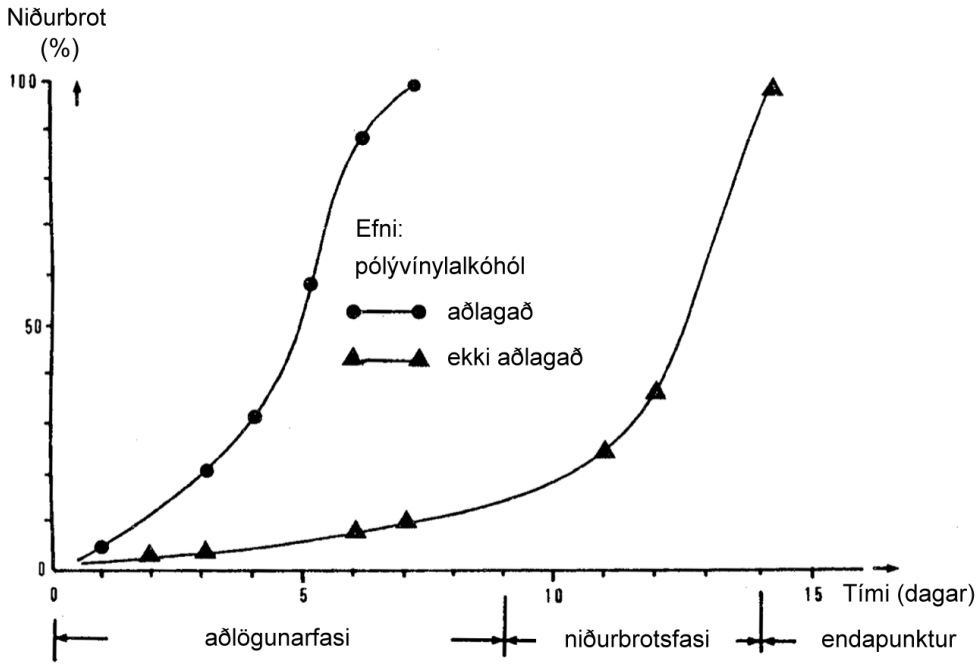
Mynd 1

Dæmi um ferla fyrir lífniðurbrot



Mynd 2

Dæmi um aðlögun seyru



C.10. **LÍFNIÐURBROT**

HERMIPRÓFARNIR MEÐ VIRKRI SEYRU

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

1.1.1. *Almennar athugasemdir*

Aðferðina er aðeins hægt að nota fyrir þau lífrænu efni sem, við prófunarstyrk:

— eru nógu leysanleg í vatni til að unnt sé að tilreiða prófunarlausnirnar,

— hafa óverulegan gufuþrýsting við prófunarskilyrðin,

— hafa ekki hamlandi áhrif á bakteríur.

Upplýsingar um innbyrðis hlutföll aðalefnisþátta prófunarefnisins koma að gagni við túlkun á niðurstöðunum sem fást, sérstaklega þegar um er að ræða lágar niðurstöður eða jaðarniðurstöður.

Æskilegt er að hafa upplýsingar um eiturhrif efnisins á örverur þegar túlka á lágar niðurstöður og velja viðeigandi prófunarstyrkleika.

1.1.2. *Ákvörðun á fullnaðarlífbrjótanleika (greining á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)/efnafræðilegri súrefnisþörf (COD))*

Tilgangurinn með aðferðinni er að ákvarða fullnaðarlífbrjótanleika með mælingu á fjarlægingu efnisins og öllum umbrotsefnum í líkani af hreinsunarstöð fyrir virka seyru við styrk sem svarar > 12 mg uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) á lítra (eða sem svarar u.þ.b. 40 mg efnafræðileg súrefnisþörf (COD) á lítra); svo virðist sem 20 mg uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) á lítra sé ákjósanlegast. (DOC: uppleyst, lífrænt kolefni, COD: efnafræðileg súrefnisþörf.)

Innihald lífræns kolefnis í prófunaríðefninu (eða efnafræðileg súrefnisþörf) prófunarefnisins verður að vera þekkt.

1.1.3. *Ákvörðun á frumlífbrjótanleika (sértæk greining)*

Tilgangurinn með aðferðinni er að ákvarða frumlífbrjótanleika efnis í líkani af hreinsunarstöð fyrir virka seyru, við styrk sem nemur um 20 mg/l, með því að beita sértækri greiningaraðferð (nota má minni eða meiri styrk ef það er hægt með hliðsjón af greiningaraðferðinni og eiturhrifunum). Þetta gerir það kleift að meta frumlífbrjótanleika efnisins (hvarf efnafræðilegrar byggingar upprunaefnisins).

Tilgangurinn með þessari aðferð er ekki að ákvarða sundrun prófunarefnisins.

Hentug greiningaraðferð fyrir ákvörðun á prófaða efninu verður að vera tiltæk.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

1.2.1. *Greining á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)/efnafræðilegri súrefnisþörf (COD)*

Fjarlæging efnisins er gefin með:

$$DR = \frac{T - (E - E_o T)}{T} \times 100\% \qquad [1(a)]$$

þar sem:

DR = fjarlæging, í hundraðshlutum, uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) á gefnum meðalviðstöðutíma með tilliti til prófunarefnisins.

T = styrkur prófunarefnisins í aðrennslinu í mg af uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) á lítra (eða sem efnafræðileg súrefnisþörf (COD) í mg á lítra).

E = styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) í frárennsli prófunareiningarinnar í mg uppleysts, lífræns kolefnis á lítra (eða sem efnafræðileg súrefnisþörf í mg á lítra)

E_o = styrkur uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) í frárennsli blankeiningarinnar í mg uppleysts, lífræns kolefnis á lítra (eða sem efnafræðileg súrefnisþörf í mg á lítra).

Niðurbrotið er sett fram sem sá hundraðshluti uppleysts, lífræns kolefni (DOC) (eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD)) sem er fjarlægður á gefnum meðalviðstöðutíma með tilliti til prófunarefnisins.

1.2.2. *Sértæk greining*

Sá hundraðshluti prófunarefnisins, sem er fjarlægður úr vatnsfasanum (R_w) á gefnum meðalviðstöðutíma, fæst með eftirfarandi formúlu:

$$R_W = \frac{C_l - C_o}{C_l} \times 100\% \qquad [1(b)]$$

þar sem:

C_1 = styrkur efnisins í aðrennsli prófunareiningarinnar (mg af efni/lítra, ákvarðaður með sértækri greiningu)

C_o = styrkur efnisins í frárennsli prófunareiningarinnar (mg af efni/lítra, ákvarðaður með sértækri greiningu)

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Þegar nýtt efni er rannsakað geta viðmiðunarefni í sumum tilvikum verið gagnleg; hins vegar er ekki enn hægt að mæla með neinum tilteknum viðmiðunarefnum.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐANNA

Við ákvörðun á fullnaðarlífbrjótanleika eru tvær tilraunaeiningar með virkri seyru (einingar fyrir OECD-staðfestingarprófun eða einingar með gropnum pottum) keyrðar hliðstætt. Prófunarefninu er bætt út í aðrennslið (tilbúið skólp eða heimilisskólp) annarrar einingarinnar en í hina er aðeins sett skólp. Við ákvörðun á frumlífniðurbroti með sértækri greiningu á aðrennsli og frárennsli er aðeins notuð ein eining.

Styrkleikar uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) (eða sem svarar efnafræðilegri súrefnisþörf (COD)) eru mældir í frárennslunum eða styrkleikar efnisins ákvarðaðir með sértækri greiningu.

Uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) af völdum prófunarefnisins er ekki mælt heldur einfaldlega tilgreint.

Við mælingar á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) (eða efnafræðilegri súrefnisþörf (COD)) er gert ráð fyrir að muninn á meðalstyrkleikum prófunar- og samanburðarfrárennslanna megi rekja til prófunarefnisins sem hefur ekki brotnað niður.

Við sértækar greiningar er unnt að mæla breytingar á styrk móðursameindarinnar (frumlífniðurbrot).

Einingarnar má starfrækja eftir „aðferðinni með tengdum einingum“ (e. *coupled units mode*) með yfirsáningarferli.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Upphafsstyrkur efnisins ræðst af því hvers konar greining er gerð og hverjar takmarkanir hennar eru.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Undirbúningur*

1.6.1.1. Búnaður

Tvær einingar af sömu tegund eru nauðsynlegar nema þegar sértækar greiningar eru gerðar. Hægt er að nota tvenns konar búnað:

OECD-staðfestingarprófun:

Búnaðurinn (sjá 1. viðbæti) samanstendur af geymsluíláti (A) fyrir tilbúið skólp, skömmtunardælu (B), loftunaríláti (C), skilju (botnfellingaríláti) (D), loftdælu (E) til að endurvinna virku seyruna og íláti (F) til að safna meðhöndlaða frárennslinu.

Ílát (A) og (F) verða að vera úr gleri eða hentugu plasti og taka a.m.k. 24 lítra. Dæla (B) verður að halda stöðugu streymi tilbúins skólps til loftunarílátsins og má þar nota hvaða hentuga kerfi sem er svo fremi að það tryggi aðstreymi og styrkleika. Við eðlilega starfrækslu er hæð skiljunnar (botnfellingarílátsins) (D) höfð þannig að loftunarílátið innihaldi þrjá lítra af vökvablöndu. Loftblöndunarkubbur (G) úr hertu gleri er hengdur við odd keilunnar í íláti (C). Loftmagnið sem dælt er í gegnum loftblöndunarkubbinn er vaktað með loftstreymismæli (H).

Loftdælan (E) er stillt þannig að virka seyran úr botnfellingarílátinu fari stöðugt og með jöfnu millibili aftur inn í hringrásina í loftunarílátinu (C).

„Gropinn pottur“

Gropni potturinn er búinn til úr þynnum úr gropnu pólýetýleni (2 mm þykku með 95 µm hámarksopstærð) sem er mótað í sívalninga sem eru 14 cm að þvermáli og með keilulaga botni sem myndar 45° horn við hliðarnar (mynd 1 og 2 í 2. viðbæti). Gropni potturinn er hafður í ógegndræpu íláti úr hentugu plasti sem er 15 cm að þvermáli og með úttaki, í 17,2 cm hæð á sívala hlutanum, en af því ræðst hversu mikið potturinn rúmar (3 lítra). Stífur stuðningshringur úr hentugu plasti er hafður utan um efri brún innra ílátsins þannig að 0,5 cm bil er fyrir frárennsli milli innra og ytra ílátsins.

Gropna pottinum má koma fyrir í hitastýrðu vatnsbaði. Í neðsta hluta innra ílátsins er komið fyrir hentugum dreifurum og þangað er veitt lofti.

Ílát (A) og (E) verða að vera úr gleri eða hentugu plasti og taka a.m.k. 24 lítra. Dæla (B) verður að halda stöðugu streymi tilbúins skólps til loftunarílátsins og má þar nota hvaða hentuga kerfi sem er svo fremi að það tryggi aðstreymi og styrkleika.

Nauðsynlegt er að hafa innri, gropna potta til vara til að skipta út pottum sem stíflast við notkun; stíflaðir pottar eru hreinsaðir með því að sökkva þeim í 24 klukkustundir í hýpóklórítlausn og þvo þá síðan vandlega í kranavatni.

1.6.1.2. Síun

Himnusíunarbúnaður og himnusíur með 0,45 µm opstærð. Himnusíur henta ef tryggt er að þær gefi hvorki frá sér kolefni né ásogi efnið í síunarþrepinu.

1.6.1.3. Skólp

Nota má annað hvort tilbúið skólp eða heimilisskólp.

Dæmi um tilbúið skólp

Leysið upp í hverjum lítra af kranavatni:

peptón:	160 mg
kjötkraft:	10 mg
þvagefni:	30 mg

NaCl:	7 mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:	2 mg
$K_2 \cdot HPO_4$:	28 mg

Heimilisskólp

Heimilisskólpi skal safna nýju á hverjum degi frá yfirfalli fyrstu botnfellingarþróar í hreinsistöð sem hreinsar aðallega heimilisskólp.

1.6.1.4. Stofnlausnir prófunarefnis

Tilreiða skal prófunarefnislausn, t.d. 1%, til að bæta í prófunareininguna. Ákvarða verður styrk efnisins til að vita hversu miklu þurfi að bæta við skólpið, eða beint í eininguna með annarri dælu, til að fá tilskilinn prófunarstyrk.

1.6.1.5. Sáð

Athugasemd: ef notað er heimilisskólp þjónar það engum tilgangi að nota sáð með litlum bakteríuþéttleika en nota má virka seyru.

Nota má ýmiss konar sáð.

Þrjú dæmi eru gefin um hentugt sáð:

a) Sáð frá annars stigs frárennsli

Sáðið skal fengið úr annars stigs frárennsli í háum gæðaflokki sem hefur verið safnað frá hreinsistöð sem hreinsar aðallega heimilisskólp. Geyma verður frárennslissýnið við loftháð skilyrði þann tíma sem líður frá sýnatöku til notkunar. Við tilreiðslu sáðsins er sýnið síað í gegnum grófa síu og fyrstu 200 ml hent. Síuvökvinn er geymdur við loftháðar aðstæður uns hann er notaður. Sáðið verður að nota sama dag og sýnið er tekið. Til sáningar eru notaðir minnst 3 ml.

b) Samsett sáð

Sáð frá annars stigs frárennsli

Sjá lýsingu hér að framan.

Sáð úr jarðvegi:

100 g af garðjarðvegi (frjósömum, ekki dauðhreinsuðum) er leystur upp í 1000 ml sviflausn með klórlausu neysluvatni. (Ekki er heppilegt að nota jarðveg sem er að stórum hluta leir, sandur eða moldarefni). Þegar búið er að hræra er sviflausnin látin setjast í 30 mínútur. Flotið er síað í gegnum grófan síupappír og fyrstu 200 ml hent. Síuvökvinn er loftblandaður tafarlaust og þar til hann er notaður. Sáðið verður að nota sama dag og sýnið er tekið.

Sáð úr yfirborðsvatni:

Annar sáðhluti er tekin úr yfirborðsvatni með meðalinnihaldi niðurbrotsvera. Sýnið er síað í gegnum grófan pappír og fyrstu 200 ml hent. Síuvökvinn er geymdur við loftháðar aðstæður uns hann er notaður. Sáðið verður að nota sama dag og sýnið er tekið.

Jöfnu rúmmáli af sáðsýnahlutunum þremur er blandað vel saman og endanlega sáðið tekið úr þessari blöndu. Til sáningar eru notaðir minnst 3 ml.

c) Sáð úr virkri seyru

Sem sáð má nota tiltekið rúmmál (ekki meira en 3 lítra) af virkri seyru (innihald svifagna allt að 2,5 g/l) sem tekin er úr loftunarþró stöðvar sem hreinsar aðallega heimilisskólp.

1.6.2. *Aðferð*

Prófunin er gerð við stofuhita en honum skal haldið milli 18–25 °C.

Ef við á má gera prófunina við lægra hitastig (niður í 10 °C); ef efnið er niðurbrotið er venjulega ekki þörf á frekari prófunum. Ef efnið er hins vegar ekki niðurbrotið verður að gera prófunina við stöðugt hitastig, milli 18–25 °C.

1.6.2.1. Tilkeyrslutímabil Seyrumyndun/stöðgun einiganna

Seyruvaxtar-/stöðgunartímabilið er tímabilið þegar styrkur svifagna í virku seyrunni og afkastageta einiganna þróast að stöðugu ástandi við prófunarskilyrðin sem eru notuð.

Tilkeyrslutímabilið er tímabilið frá því að prófunarefninu er fyrst bætt í og þar til fjarlæging þess nær jafnvægi (hlutfallslega stöðugu gildi). Þetta tímabil má ekki vera lengra en sex vikur.

Matstímabilið er þriggja vikna tímabil, þrjár vikur frá því að fjarlæging prófunarefnisins nær hlutfallslega stöðugu og yfirleitt háu gildi. Þegar um er að ræða efni sem sýna lítið eða ekkert niðurbrot fyrstu sex vikurnar telst matstímabilið vera næstu þrjár vikurnar.

Byrjað er á því að fylla einingunа, eða einingarnar, sem þarf fyrir eina prófun með sáðinu sem er blandað aðrennsli.

Þá eru loftblandarinn (og loftdælan (E) ef um er að ræða OECD-staðfestingarprófunareiningar) og skömmtunardælan (B) gangsett.

Aðrennsli án prófunarefnis verður að fara í gegnum loftunarílát C, annaðhvort með hraðanum einn lítri á klukkustund eða hálfur lítri á klukkustund; þetta gefur meðalviðstöðutíma sem er annaðhvort þrjár eða sex klukkustundir.

Stjórna á hraða loftunar þannig að innihaldinu í íláti (C) sé stöðugt haldið í sviflausn og innihald uppleysts súrefnis sé minnst 2 mg/l.

Koma ber í veg fyrir froðumyndun með viðeigandi aðferðum. Ekki má nota froðueyða sem hafa hamlandi áhrif á virku seyruna.

Seyra sem safnast við efri brún loftunarílátsins (C) (og, ef um er að ræða OECD-staðfestingarprófunar-einingar, neðst í botnfellingarþrónni (D) og í hringrásinni) skal flutt aftur yfir í blandaða vökvann minnst einu sinni á dag með burstun eða öðrum viðeigandi aðferðum.

Ef seyran fellur ekki til botns má auka eðlismassa hennar með því að bæta 2 ml skömmtum af 5% járnklóríðlausn út í og endurtaka það eftir þörfum.

Frárennslinu er safnað í ílát (E) eða (F) í 20–24 klst. og þá er hrært rækilega í og tekið sýni. Hreinsa verður þró (E) eða (F) vandlega.

Til að vakta og stjórna skilvirkni ferlisins er efnafræðileg súrefnisþörf (COD) eða uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) í síuvökva uppsafnaða frárennslisins mælt minnst tvisvar í viku, sem og efnafræðileg súrefnisþörf eða uppleyst, lífrænt kolefni í síaða aðrennslinu (nota skal himnusíu með 0,45 µm opstærð og er fyrstu 20 ml (u.þ.b.) síuvökvans hent).

Minnkunin á efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) eða uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) ætti að jafnast út þegar búið er að ná svo til reglubundnu, daglegu niðurbroti.

Þurrefnisinnihald virku seyrunnar í loftunarþrónni skal ákvarðað tvisvar í viku (í g/l). Einingarnar má starfrækja á tvo vegu: annaðhvort er þurrefnisinnihald virku seyrunnar ákvarðað tvisvar í viku, ef það er meira en 2,5 g/l verður að henda virku seyrunni sem er umfram það, eða 500 ml af blönduðum vökva eru fjarlægðir daglega úr hverjum potti til að ná sex daga meðalviðstöðutíma fyrir seyruna.

Þegar mældir og metnir mæliþættir (skilvirkni ferlisins (með tilliti til fjarlægingar samkvæmt efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) eða á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)), seyra, styrkur, sethæfi seyrunnar, grugg frárennslis o.s.frv.) eininganna tveggja eru orðnir nægilega stöðugir má bæta prófunarefninu í aðrennsli annarrar einingarinnar í samræmi við 1.6.2.2.

Einnig má bæta prófunarefninu við í upphafi seyruvaxtartímabilsins (1.6.2.1), einkum ef seyru er bætt út í sem sáði.

1.6.2.2. Prófunaraðferð

Prófunarskilyrðum tilkeyrslutímabilsins er haldið óbreyttum og nægilegu magni af stofnlausn prófunarefnisins (u.þ.b. 1%) er bætt út í aðrennsli prófunareiningarinnar til að prófunarefnið nái tilætluðum styrk í skólpinu (efnafræðileg súrefnisþörf (DOC) sem svarar u.þ.b. 10–20 mg á lítra eða 40 mg af uppleystu, lífrænu kolefni (COD) á lítra). Þetta má gera með því að blanda stofnlausninni við skólpið daglega eða með því að nota aðskilið dælukerfi. Þessum styrk má ná smám saman. Ef prófunarefnið hefur engin eiturhrif á virku seyruna má einnig gera prófanir með hærri styrkleikum.

Í blankeininguna er aðeins leitt aðrennsli án viðbættra efna. Hæfilegt magn er tekið úr frárennslunum til greiningar og síað í gegnum himnusíur (0,45 μm) og fyrstu 20 ml (u.þ.b.) af síuvökvanum hent.

Greina skal síuðu sýnin samdægurs en að öðrum kosti verður að varðveita þau með aðferð sem hentar, t.d. með því að nota 0,05 ml af 1% kvikasilfursklóríðlausn ($HgCl_2$) fyrir hverja 10 ml af síuvökva eða með því að geyma þau við 2–4 °C í allt að 24 klukkustundir eða undir -18 °C ef um lengri tíma er að ræða.

Tilkeyrslutímabilið, með viðbættu prófunarefni, skal ekki vera lengra en sex vikur og matstímabilið skal ekki vera styttra en þrjár vikur, þ.e. að um 14–20 ákvarðanir liggi fyrir við útreikning á lokaniðurstöðu.

Aðferð með tengdum einingum

Tenging eininganna fæst með því að víxla 1,5 lítrum af blönduðum vökva (seyra meðtalin) úr loftunarílátunum fyrir virku seyruna milli eininganna tveggja einu sinni á dag. Ef um er að ræða prófunarefni sem ísogast mjög eru aðeins teknir 1,5 lítrar af floti úr botnfellingarílátunum og hellt í ílátið með virku seyrunni í hinni einingunni.

1.6.2.3. Greining

Tvenns konar greiningu má gera til að fylgjast með hegðun efnisins:

Efnafræðileg súrefnisþörf (DOC) og uppleyst, lífrænt kolefni (COD)

Ákvarðanir á styrk samkvæmt uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eru gerðar í tveimur eins sýnum með kolefnisgreiningartækinu og/eða með gildum efnafræðilegrar súrefnisþarfar (COD) skv. 2. heimild.

Sértæk greining

Styrkleikar prófunarefnisins eru ákvarðaðir með viðeigandi greiningaraðferð. Þegar unnt er skal gera sértæka greiningu á efninu sem ísogast í seyruna.

2. **GÖGN OG MAT**

2.1. AÐFERÐ MEÐ TENGDUM EININGUM

Í „aðferðinni með tengdum einingum“ er notuð dagleg fjarlæging, DR, reiknuð út skv. 1.2.1.

Gildi fyrir daglega fjarlægingu, DR, eru leiðrétt í DRc fyrir efnisyfirfærslu vegna yfirsáningarferlis samkvæmt jöfnu [2], ef meðalviðstöðutími er þrjár klukkustundir, eða jöfnu [3] ef hann er sex klukkustundir.

$$DRc = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \qquad [2]$$

$$DRc = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \qquad [3]$$

Meðaltal DRc-gildanna er reiknað og einnig staðalfrávikið samkvæmt jöfnu [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(\overline{DRc} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \qquad [4]$$

þar sem:

S_{DRc} = staðalfrávik DRc-gildanna

$\overline{DRc}$ = meðaltal DRc-gildanna

n = fjöldi ákvarðana.

Einförum DRc-raðanna er eytt samkvæmt viðeigandi tölfræðiaðferð, t.d. Nalimov (6. heimild), við 95% líkindamörk og meðaltalið og staðalfrávikin fyrir DRc-gögnin, án einfaranna, endurreiknuð.

Lokaniðurstaðan er síðan reiknuð með jöfnu [5] sem:

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}^{S}}{\sqrt{n}}DRc \qquad [5]$$

þar sem:

$t_{n-1;\alpha}$ = töflugildið t fyrir n gildispör af E og E_o og tölfræðilegt öryggi P (P =1 – α) þar sem P er 95% (1. heimild).

Niðurstöður eru settar fram sem meðaltal með vikmörkum við 95% líkindamörkin, tilheyrandi staðalfrávik og fjöldi gagna í einfaralausu DRc-gagnamenginu og fjöldi einfara, t.d.

DRc = 98,6 ± 2,3% fjarlæging DOC
s = 4,65% fjarlæging DOC
n = 18
x = fjöldi einfara.

2.2. AÐFERÐ MEÐ ÓTENGDUM EININGUM

Kanna má skilvirkni eininganna sem hér segir:

$$\text{fjarlæging í hundraðshlutum COD eða DOC} = \frac{\text{CODeðarDOCskólp} - \text{CODeðaDOCfrárennsli}}{\text{CODeðaDOCskólp}} \times 100$$

Þessa daglegu eyðingu má setja fram með myndrænni útfærslu til að leiða í ljós hvers kyns leitni, t.d. aðlögun.

2.2.1. Notkun á ákvörðunum á efnafræðilegri súrefnisþörf (COD)/uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)

Dagleg eyðing, DR, er reiknuð í samræmi við 1.2.1.

Meðaltal DR-gildanna er reiknað, einnig staðalfrávikið samkvæmt:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(\overline{DR} - DR_i\right)^2}{n-1}} \qquad [6]$$

þar sem:

s_{DR} = staðalfrávik DR_i-gildanna,

$\overline{DR}$ = meðaltal DR_i-gildanna

n = fjöldi ákvarðana.

Einförum DR-raðanna er eytt samkvæmt viðeigandi tölfræðiaðferð, t.d. Nalimov (6. heimild), við 95% líkindamörk og meðaltalið og staðalfrávikið fyrir DR-gögnin, án einfaranna, eru endurreiknuð.

Lokaniðurstaðan er síðan reiknuð með jöfnu [7] sem:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha^S}{\sqrt{n}} DR \qquad [7]$$

þar sem:

$t_{n-1};\alpha$ = töflugildið t fyrir n gildispör E og E_o og tölfræðilegt öryggi P (P =1 – α) þar sem P er sett við 95% (1. heimild).

Niðurstaðan er sett fram sem meðaltal með vikmörk við 95% líkindamörk, tilheyrandi staðalfrávik og fjöldi gagna í einfaralausu DR-gagnamenginu og fjöldi einfara, t.d.:

DR = (98,6±2,3)% fjarlæging DOC

s = (4,65)% fjarlæging DOC

n = 18

x = fjöldi einfara.

2.2.2. *Notkun sértækrar greiningar*

Sá hundraðshluti prófunarefnis sem er fjarlægður úr vatnsfasanum, (R_w), er reiknaður út skv. 1.2.2.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— eyðublaðið sem birt er í 3. viðbæti og sýnir skilyrðin fyrir prófunina,

— hvor búnaðurinn var valinn (OECD staðfestingarprófun eða gropinn pottur),

— hvor vinnuaðferðin var valin: aðferð með tengdum einingum eða ótengdum einingum,

— hvort skólpið er tilbúið skólp eða heimilisskólp og ef um heimilisskólp er að ræða skal gefa upp sýnatökudagsetningu og -stað,

— hvaða sáð er notað, ásamt sýnatökudagsetningu og -stað,

— yfirlýsing með lýsingu á greiningaraðferðinni ef gerðar voru sértækar greiningar,

— ferill fjarlægingar sem svarar uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) eða samkvæmt efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) á móti tíma, þ.m.t. tilkeyrslu- og matstímabil,

— endurheimt prófunarefnisins í stofnlausninni í efnagreiningu, sem uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eða efnafræðileg súrefnisþörf (COD),

— ferill hundraðshluta fjarlægingar prófunarefnisins úr vatnsfasanum á móti tíma (tilkeyrslu- og matstímabil) ef gerðar voru sértækar greiningar,

— meðalfjarlæging uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) eða sem svarar efnafræðilegri súrefnisþörf (COD) í prófunarefni og staðalfrávik eru reiknuð út frá niðurstöðum matstímabilsins, þ.e. þegar fjarlæging prófunarefnisins er stöðug eða á tímabili stöðugrar starfrækslu,

— ferill fyrir styrk virkrar seyru á móti tíma,

— hvers kyns athugasemdir varðandi virku seyruna (förgun umframmagns af seyru, seyruþan, $FeCl_3$ o.s.frv.),

— styrkur efnisins sem notað var í prófuninni,

— allar niðurstöður varðandi greiningar sem gerðar voru á seyrunni,

— allar upplýsingar og tilraunaniðurstöður varðandi prófunarefnið sem og viðmiðunarefnið, ef það var notað,

— vísindalegur rökstuðningur fyrir öllum breytingum á aðferðinni.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Ef fjarlæging prófunarefnisins úr vatnsfasanum er lítil getur það verið vegna þess að prófunarefnið er hamlandi fyrir örverurnar. Þetta getur einnig komið fram sem rof og tap á seyru, sem veldur gruggugu floti, og sem minnkun á skilvirkni tilraunaeiningarinnar við fjarlægingu, samkvæmt efnafræðilegri súrefnisþörf (DOC) (eða uppleystu, lífrænu kolefni (DOC)).

Eðlisefnafræðilegt ásog getur stundum haft áhrif. Muninn á líffræðilegri verkun á sameindina og eðlisefnafræðilegu ásogi má leiða í ljós með greiningu á seyrunni eftir nægilegt afsog.

Frekari prófanir eru nauðsynlegar ef gera á greinarmun á lífniðurbroti (eða lífniðurbroti að hluta til) og ásogi.

Það má gera á ýmsa vegu en mest sannfærandi er að nota flotið sem sáð í prófun með grunnuppsetningu (helst öndunarprófun).

Ef það mælist mikil fjarlæging á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC), eða samkvæmt efnafræðilegri súrefnisþörf (COD), er það vegna lífniðurbrots en ef fjarlæging er lítil er ekki hægt að greina á milli lífniðurbrots og fjarlægingar. Sem dæmi má nefna að sýni leysanlegt efnasamband 98% háan ásogsstuðul, og 10% af umframseyru er aftappað á dag, getur fjarlæging verið allt að 40%; ef 30% af umframseyru er aftappað getur fjarlæging vegna ásogs á umframseyru og fjarlægingar með henni verið allt að 65% (4. heimild).

Þegar sértækar greiningar eru notaðar skal hafa í huga hvaða þýðingu bygging efnisins hefur fyrir sértæku greininguna sem notuð er. Í því tilviki er ekki hægt að skýra fyrirbærið, sem fram kemur, sem breytingu á efninu í ólífrænt efni.

4. **HEIMILDIR**

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C9 Degradation Test — Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, (OJ L 251, 19.9.1984, bls. 1).

3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

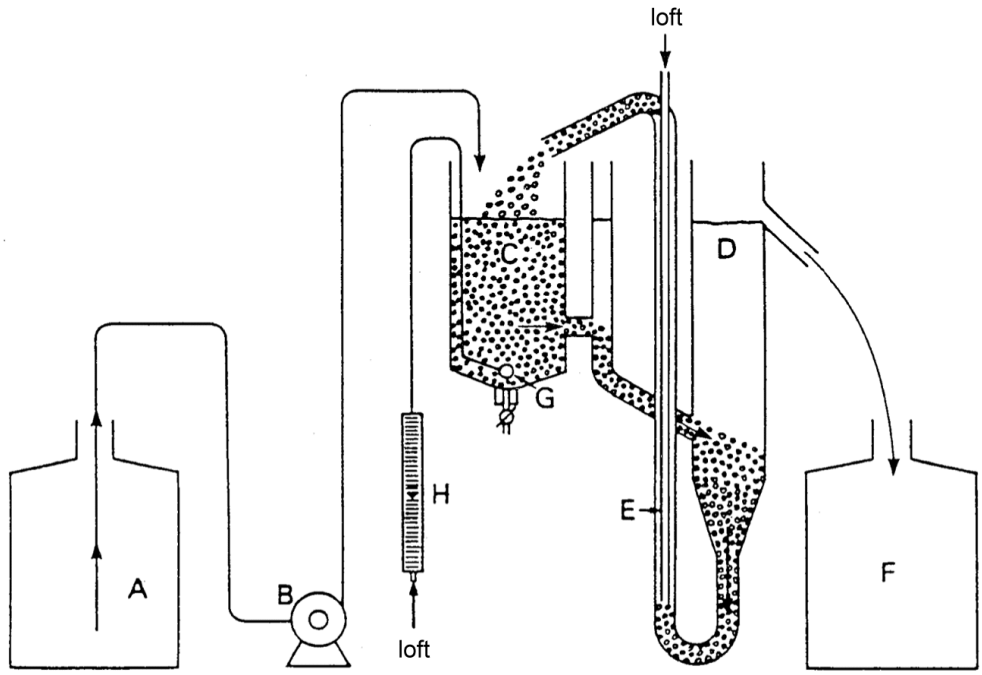
4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 5, No 2, June 1981, bls. 161-171.

5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, (Stjtíð. Nr. L 109, 22.4.1982, bls. 1), amending Council Directives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, (Stjtíð. EB L 347, 17.12.1973, bls. 51).

6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreßertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Oberprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie, 303 (1980), bls. 406-408.

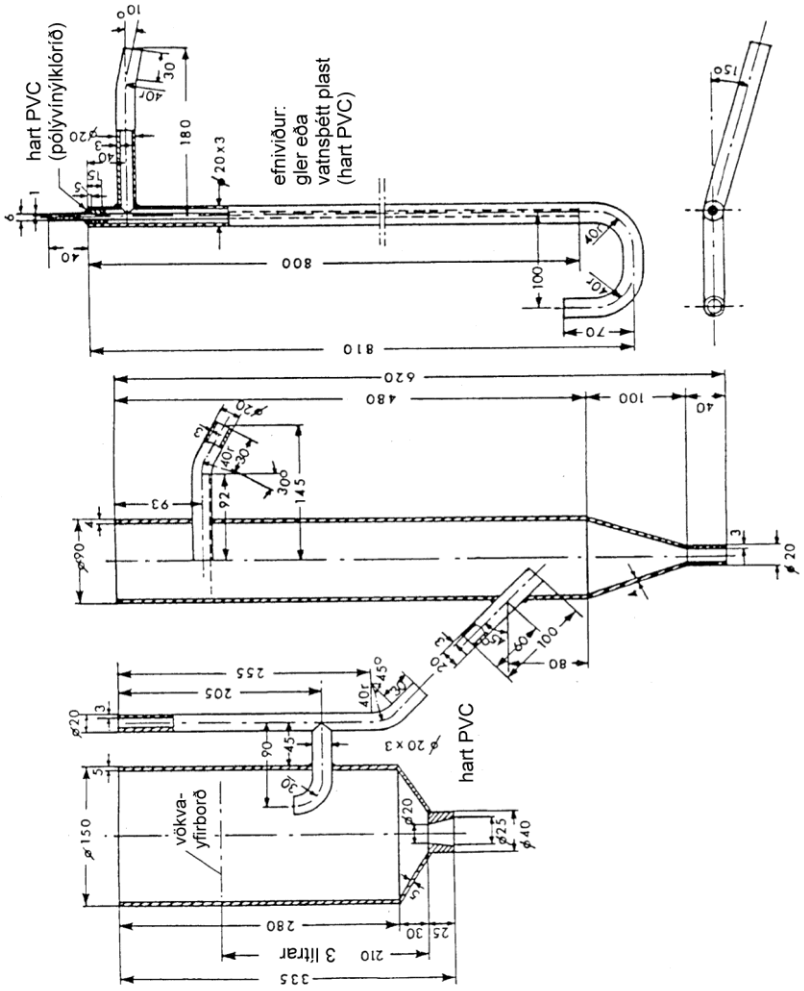
1. viðbætir

Mynd 1



Skýringar: A = geymsluílát,
B = skömmtunarílát,
C = loftunarhólf (rúmtak 3 l),
D = botnfellingarílát,
E = loftdæla,
F = söfnunarílát,
G = loftblandari,
H = loftstreymismælir (valkvæður).

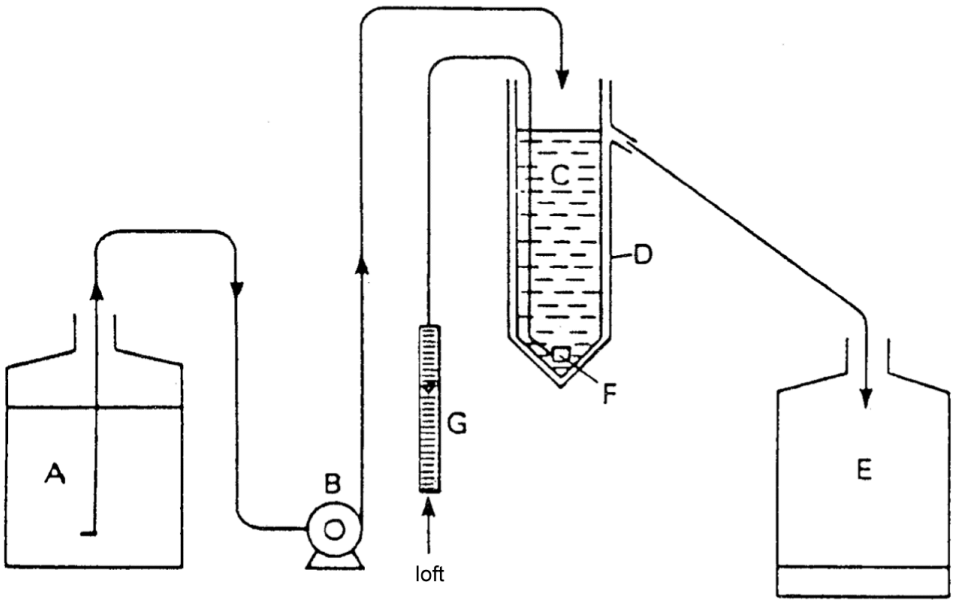
Mynd 2


hart PVC
(pólývínýlklóríð)
efniviður:
gler eða
vatnsþétt plast
(hart PVC)
hart PVC
vökva-
yfirborð
3 lítrar

2. viðbætir

Mynd 1

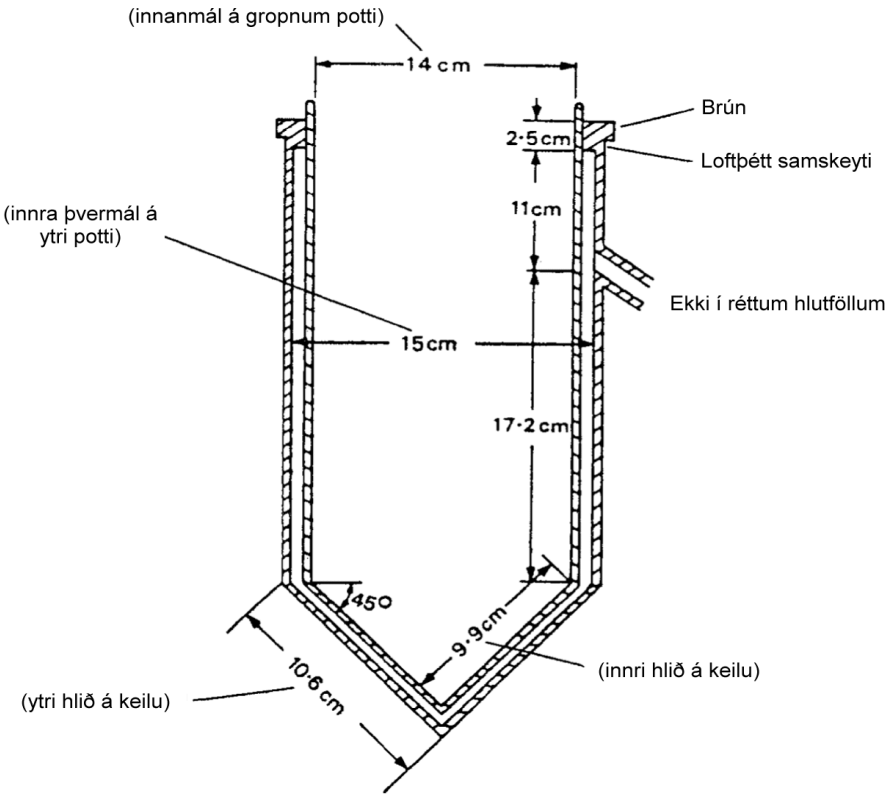
Búnaður sem er notaður við mat á lífbrjótanleika



Skýringar:
A = geymsluílát,
B = skömmtunardæla,
C = gropið loftunarílát,
D = ytra ógegndræpt ílát,
E = safnílát fyrir frárennsli,
F = loftdreifingarsteinn,
G = rennslismælir (valkvæður).

Mynd 2

Þriggja lítra gropinn loftunarpottur



3. viðbætir

Prófunarskilyrði fyrir hermiprófun með virkri seyru

Merkt við fyrir hverja samstæðu

Búnaður	
OECD-staðfestingarbúnaður	☐
Gropinn pottur	☐
Starfræksla	
Stök eining	☐
Tengdar einingar	☐
Ótengdar einingar	☐
Yfirsáning	
Engin	☐
Virk seyra	☐
Flot	☐
Meðalviðstöðutími	
Þrjár klukkustundir	☐
Sex klukkustundir	☐
Grunnnæringarefni	
Heimilisskólp	☐
Tilbúið skólp	☐
Sáð	
Annars stigs frárennsli	☐
Samsett	☐
Virk seyra	☐
Íblöndun prófunarefnis	
Frá byrjun	☐
Aukning í áföngum	☐
Eftir seyrumyndun	☐
Greining	
Sértæk	☐
Efnafræðileg súrefnisþörf (COD)	☐
DOC	☐

C.11. **LÍFNIÐURBROT**

PRÓFUN Á ÖNDUNARHÖMLUN Í VIRKRI SEYRU

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Með aðferðinni sem hér er lýst eru metin áhrif prófunarefnis á örverur með því að mæla öndun þeirra (e. *respiration rate*) við skilgreindar aðstæður með mismunandi styrkleikum af prófunarefninu.

Tilgangurinn með þessari aðferð er að veita fljótvirka skimun sem greinir efni sem geta haft skaðleg áhrif í hreinsistöðvum með loftháðum örverum og til að gefa vísbendingu um styrkleika prófunarefna sem eru ekki hamlandi og henta til notkunar í prófunum á lífbrjótanleika.

Gera má skammtastærðaprófun á undan endanlegri prófun. Hún veitir upplýsingar um þá röð styrkleika sem nota þarf í meginprófuninni.

Hluti af prófunartilhöguninni eru tveir samanburðir án prófunarefnis, annar við upphaf og hinn við lok prófunarsyrpunnar. Einnig skal notað viðmiðunarefni til að fylgjast með hverri lotu af virkri seyru.

Þessi aðferð hentar best fyrir efni sem eru líkleg til að verða eftir í vatni vegna vatnsleysni þeirra og lítillar rokgirni.

Mögulega er ekki hægt að ákvarða EC_{50} fyrir efni með takmarkaða leysni í prófunarmiðlinum.

Niðurstöður sem byggjast á súrefnisupptöku geta leitt til rangra niðurstaðna þegar prófunarefnið hefur tilhneigingu til að aftengja oxandi fosfórun.

Gagnlegt er að hafa eftirfarandi upplýsingar til að framkvæma prófunina:

— vatnsleysni,

— gufuþrýsting,

— byggingarformúlu,

— hreinleika prófunarefnisins.

Ráðleggingar

Virk seyra getur innihaldið lífverur sem eru geta verið sjúkdómsvaldandi og skal meðhöndla með varúð.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Öndunin er súrefnisupptaka skólpörvera í loftháðri seyru, almennt gefinn upp sem mg af O_2 í mg af seyru á klukkustund.

Til að reikna út hamlandi áhrif prófunarefnis í tilteknum styrk er öndunin gefin upp sem hundraðshluti af meðaltali öndunar í samanburðunum tveimur:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \% \text{ hömlun}$$

þar sem:

R_s = súrefnisupptaka við prófaðan styrkleika af prófunarefni

R_{c1} = súrefnisupptaka, samanburður 1

R_{c2} = súrefnisupptaka, samanburður 2

EC_{50} í þessari aðferð er sá styrkleiki prófunarefnisins þegar öndunin er 50% af önduninni hjá samanburðinum við skilyrði sem lýst er í aðferðinni.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Mælt er með að notað sé 3,5-díklórfenól, sem þekkt er að hamli öndun, sem viðmiðunarefni og prófað fyrir EC_{50} á hverri lotu af virkri seyru til að fylgjast með því að næmi seyrunnar sé ekki afbrigðilegt.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Öndun virkrar seyru, sem er í stöðluðu magni af tilbúnu skólpi, er mæld eftir 30 mínútna eða þriggja klukkustunda snertitíma, eða bæði. Öndun sömu virku seyrunnar, í snertingu við ýmsa styrkleika prófunarefnisins og við skilyrði sem eru að öðru leyti jafngild, er einnig mæld. Hamlandi áhrif prófunarefnisins við tiltekinn styrk eru gefin upp sem hundraðshluti af meðaltali öndunarinnar í samanburðunum tveimur. EC_{50} gildi er reiknað út frá ákvörðunum við mismunandi styrki.

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Prófunarniðurstöðurnar eru gildar ef:

— aðeins 15% munur er á milli öndunarinnar í samanburðunum tveimur,

— EC_{50} (30 mínútna og/eða þriggja klukkustunda) fyrir 3,5-díklórfenól er á viðurkennda bilinu 5 til 30 mg/lítra.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Prófefni*

1.6.1.1. Lausnir af prófunarefninu

Lausnir af prófunarefninu eru nýtilreiddar við upphaf rannsóknarinnar með því að nota stofnlausn. Styrkur stofnlausnar upp á 0,5 g/lítra er hæfilegur ef verkferlinu sem mælt er með hér fyrir neðan er fylgt.

1.6.1.2. Lausn af samanburðarefni

Lausn af 5,5-díklórfenóli er t.d. hægt að tilreiða með því að leysa upp 0,5 g af 3,5-díklórfenóli í 10 ml af 1M NaOH, þynna í um það bil 30 ml með eimuðu vatni, bæta við meðan hrært er 0,5M H_2SO_4 þar til útfelling byrjar — til þess þarf u.þ.b. 8 ml of 0,5M H_2SO_4 — og þynna að lokum blönduna í einn lítra með eimuðu vatni. pH-gildið ætti þá að vera á bilinu 7 til 8.

1.6.1.3. Tilbúið skólp

Tilbúið skólp er gert með því að leysa upp eftirfarandi magn af efnum í einum lítra af vatni:

— 16 g af peptóni,

— 11 g af kjötkrafti,

— 3 g af þvagefni,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

1. athugasemd: Þetta tilbúna skólp er 100 falt þykkni úr því sem lýst er í tækniskýrslu OECD „Proposed method for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (11. júní, 1976), að viðbættu díkalíumvetnisfosfati.

2. athugasemd: ef tilreiddi miðillinn er ekki notaður strax skal geyma hann í myrkri við 0 til 4 °C, ekki lengur en í eina viku, við skilyrði sem ekki valda neinum breytingum á samsetningu hans. Miðilinn má einnig dauðhreinsa fyrir geymslu eða bæta peptóninu og kjötkraftinum við hann stuttu áður en prófunin er framkvæmd. Fyrir notkun skal blanda honum vandlega saman og stilla sýrustigið.

1.6.2. *Búnaður*

Mælibúnaður: smáatriði í hönnuninni eru ekki úrslitaatriði. Þó skal vera kollrúm og neminn skal falla þétt í hálsinn á mæliflöskunni.

Venjulegur rannsóknarstofubúnaður, og einkum eftirfarandi, er nauðsynlegur:

— mælibúnaður,

— loftunarbúnaður,

— pH-rafskaut og mælitæki,

— O_2-rafskaut.

1.6.3. *Tilreiðsla sáðsins*

Virk seyra frá skólphreinsistöð, sem aðallega meðhöndlar heimilisskólp, er notuð sem örverusáð fyrir prófunina.

Ef nauðsynlegt er má, þegar komið er aftur á rannsóknarstofuna, fjarlægja grófar agnir með því að láta þær setjast í stuttan tíma, t.d. 15 mínútur, og taka af efra lagi fínni fastra efna til notkunar. Einnig má blanda seyruna með blandara í nokkrar sekúndur.

Ef talið er að hamlandi efni sé til staðar skal að auki þvo seyruna með kranavatni eða jafnþrýstinni lausn. Eftir skiljun í skilvindu er flotinu hellt af (þessi tilhögun er endurtekin þrisvar).

Lítið magn af seyrunni er vegið og þurrkað. Út frá niðurstöðunni úr því er hægt að reikna út hvaða magn af blautri seyru þarf að leysa í vatni til að fá virka seyru með blöndu af vökva og svifögnum sem er á bilinu 2 til 4 g/lítrar. Þetta gildi gefur styrk milli 0,8 og 1,6 g/lítra í prófunarmiðlinum ef verkferlinu sem mælt er með hér fyrir neðan er fylgt.

Ef ekki er hægt að nota seyruna sama dag og henni er safnað er 50 ml af tilbúnu skólpi, tilreiddu eins og lýst er að ofan, bætt í hvern lítra af virku seyrunni; þetta er svo loftað yfir nótt við 20 ± 2 °C. Blandan er svo loftuð áfram fyrir notkun yfir daginn. Fyrir notkun er sýrustig athugað og stillt, ef nauðsynlegt er, í pH-gildið 6 til 8. Ákvörðun á svifögnunum í blandaða vökunum skal gerð eins og lýst er í liðnum hér á undan.

Ef nota þarf sömu seyrulotu fleiri daga í röð (hámark fjóra daga) er öðrum 50 ml af tilbúnu skólpi bætt við í hvern lítra af seyru í lok hvers vinnudags.

1.6.4. *Framkvæmd prófunarinnar*

Tímalengd/snertitími:	30 mínútur og/eða þrjár klukkustundir, loftun fer fram á meðan
Vatn:	Neysluvatn (afklórað ef nauðsyn krefur)
Loftbirgðir	Hreint, olíulaust loft. Loftstreymi 0,5 til 1 lítri/mínútu
Mælitæki	Flatbotna flaska, t.d. BOD-flaska

Súrefnismælir:	Hentugt súrefnisrafskaut, með skrásetjara
Næringarlausn:	Tilbúið skólp (sjá hér að framan)
Prófunarefni:	Prófunarlausnin er nýtilreidd við upphaf prófunarinnar
Viðmiðunarefni:	t.d. 3,5-díklórfenól (a.m.k. þrír styrkleikar)
Samanburður:	Sýni með sáði en án prófunarefnis
Hitastig:	20 ± 2 oC

Tillaga að verkferli við tilraunir, sem má fylgja fyrir bæði prófunar- og viðmiðunarefni fyrir þriggja klukkustunda snertitímann, er sett fram hér að neðan:

Notuð eru nokkur ílát (t.d. eins lítra bikarglös).

Nota skal a.m.k. fimm styrkleika á styrkbilum með föstum stuðli sem æskilegt er að sé ekki yfir 3,2.

Á tíma „0“ eru 16 ml af tilbúna skólpinu þynntir í 300 ml með vatni. 200 ml af örverusáði er bætt við og allri blöndunni (500 ml) hellt í fyrsta ílátið (fyrsti samanburður, C_1).

Prófunarílátin skulu loftuð stöðugt til að tryggja að uppleyst O_2 fari ekki niður fyrir 2,5 mg/lítra og að rétt fyrir mælingu á önduninni sé styrkur O_2 um 6,5 mg/lítra.

Á tíma „15 mínútur“ (15 mínútur er valið af handahófi en er hentugt tímabil) er framangreint endurtekið fyrir utan að 100 ml af stofnlausn prófunarefnisins er bætt í 16 ml af tilbúnu skólpi áður en bætt er við vatni að 300 ml og örverusáði að rúmmálinu 500 ml. Þessari blöndu er síðan hellt í annað ílát og loftuð eins og framangreint. Þetta ferli er endurtekið á 15 mínútna fresti með mismunandi magni af stofnlausn prófunarefnisins þannig að röð af ílátum með mismunandi styrkleika prófunarefnisins fáist. Að lokum er tilreiddur annar samanburður (C_2).

Eftir þrjár klukkustundir er sýrustigið skráð og vel blönduðu sýni af innihaldi fyrsta ílátsins hellt í mælitækið og öndunin mæld í allt að 10 mínútur.

Þessi ákvörðun á innihaldi hvers íláts er endurtekin á 15 mínútna fresti þannig að snertitíminn í hverju íláti sé þrjár klukkustundir.

Viðmiðunarefnið er prófað á hverri lotu örverusáðs á sama hátt.

Annað fyrirkomulag (t.d. fleiri en einn súrefnismælir) er nauðsynlegt ef mælingar eru gerðar eftir 30 mínútna snertingu.

Ef mæla þarf efnafræðilega súrefnisupptöku (e. *chemical oxygen consumption*), eru tilreidd fleiri ílát með prófunarefni, tilbúnu skólpi og vatni en engri virkri seyru. Súrefnisupptaka er mæld og skráð eftir 30 mínútna og/eða þriggja klukkustunda loftunartíma (snertitíma).

2. **GÖGN OG MAT**

Öndunin er reiknuð út frá kúrfunni milli u.þ.b. 6,5 mg O_2/lítra og 2,5 mg O_2/lítra eða yfir 10 mínútna tímabil þegar öndunin er lítil. Mælingin á önduninni skal gerð yfir línulegum hluta ferilsins.

Ef meira en 15% munur er á milli öndunarinnar í samanburðunum tveimur eða ef EC_{50} (30 mínútna og/eða þriggja klukkustunda) fyrir viðmiðunarefnið er ekki á viðurkenndu bili (5 til 30 mg/lítra fyrir 3,5-díklórfenól), er prófunin ógild og hana þarf að endurtaka.

Hundraðshlutfallsleg hömlun er reiknuð út við hvern prófunarstyrk (sjá lið 1.2). Hlutfallsleg hömlun er teiknuð á móti styrk á log-normal pappír (eða log-líkindapappír) og EC_{50} gildi leitt út.

95% öryggismörk fyrir EC_{50}-gildin er hægt að ákvarða með stöðluðum verkferlum.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— prófunarefni: efnafræðileg sanngreiningargögn,

— prófunarkerfi: uppruni, styrkur og hvers konar formeðhöndlun á virku seyrunni,

— prófunarskilyrði:

  — sýrustig hvarfblöndunnar fyrir öndunarmælinguna,

  — prófunarhitastig,

  — tímalengd prófunar,

  — viðmiðunarefni og mælt EC_{50} fyrir það,

  — súrefnisupptaka án tilstillis lífvera (ef einhver).

— niðurstöður:

  — öll mæld gögn,

  — hömlunarferill og aðferð við útreikning á EC_{50},

  — EC_{50} og ef mögulegt er, 95% öryggismörk, EC_{20} og EC_{80},

  — allar athuganir og hvers kyns frávik frá þessari prófunaraðferð sem gætu hafa haft áhrif á niðurstöðuna.

3.2. TÚLKUN GAGNA

Aðeins skal líta á EC_{50}-gildið sem vísbendingu um líkleg eiturhrif prófunarefnisins, annað hvort á skólphreinsun með virkri seyru eða á örverur í skólpi, þar sem ekki er hægt að líkja nákvæmlega eftir hinu flókna samspili sem á sér stað í umhverfinu með prófun á rannsóknarstofu. Prófunarefni sem geta haft hamlandi áhrif á oxun ammoníaks geta einnig valdið óvenjulegum hömlunarferlum. Til samræmis við það ber að gæta varúðar við túlkun slíkra ferla.

4. **HEIMILDIR**

1) International Standard ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11,1977, bls. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, bls. 245.

4) ETAD (Ecological and Tox.icological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, einnig lýst af:

5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, bls. 80.

6) Schefer, W., Textilveredlung 6,1977, bls. 247.

7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, Decision of the Council C(84) 30 final.

C.12. **LÍFNIÐURBROT**

BREYTT SCAS-PRÓFUN

1. **AÐFERÐ**

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með aðferðinni er að meta mögulegan fullnaðarlífbrjótanleika vatnsleysanlegra, órokgjarnra lífrænna efna þegar þau komast í snertingu við hlutfallslega mikla þéttni örvera yfir langt tímabil. Lífvænleika örveranna er viðhaldið yfir þetta tímabil með því að bæta daglega við skólpi sem hefur fengið að setjast til. (Skólpið má geyma við 4 °C um helgar ef þörf krefur. Að öðrum kosti má nota tilbúna skólpið í staðfestingarprófun Efnahags- og framfarastofnunarinnar).

Eðlisefnafræðilegt ásog á svifagnirnar getur átt sér stað og taka verður tillit til þess þegar niðurstöðurnar eru túlkaðar (sjá lið 3.2).

Vegna hins langa kyrrstöðutímabils vökvafasans (36 klst.) og lotubundinnar íblöndunar næringarefna hermir prófunin ekki eftir skilyrðunum sem ríkja í skólphreinsistöð. Niðurstöðurnar sem fást með mismunandi prófunarefnum benda til að mikið lífniðurbrot sé mögulegt í prófuninni.

Skilyrðin sem prófunin veitir eru mjög hagstæð fyrir val og/eða aðlögun örvera sem geta brotið niður prófunarefnasambandið. (Aðferðina má einnig nota til að búa til aðlagað sáð til notkunar í öðrum prófunum).

Í þessari aðferð er mælingin á styrk uppleysts, lífræns kolefnis notuð til að meta loka lífbrjótanleika prófunarefnanna. Æskilegra er að ákvarða uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) eftir sýringu og skolun en sem muninn á heildarkolefni og ólífrænu kolefni.

Það getur gert kleift að meta frumlífniðurbrot efnisins (hvarf efnafræðilegrar byggingar upprunaefnisins) ef notuð er sértæk greiningaraðferð samhliða.

Aðferðina er aðeins hægt að nota fyrir þau lífrænu prófunarefni sem, við prófunarstyrk,:

— eru leysanleg í vatni (a.m.k. 20 mg af uppleystu, lífrænu kolefni/l),

— hafa óverulegan gufuþrýsting,

— hafa ekki hamlandi áhrif á bakteríur,

— ásogast ekki marktækt innan prófunarkerfisins,

— tapast ekki úr prófunarlausninni með froðumyndun.

Innihald lífræns kolefnis í prófunarefninu verður að vera þekkt.

Upplýsingar um innbyrðis hlutföll aðalefnisþátta prófunarefnisins koma að gagni við túlkun á niðurstöðunum sem fást, sérstaklega þegar um er að ræða lágar niðurstöður eða jaðarniðurstöður.

Upplýsingar um eiturhrif efnisins á örverurnar í efninu geta verið gagnlegar við túlkun á lágum gildum og við val á hæfilegum prófunarstyrk.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

C_T = styrkur prófunarefnasambands sem lífrænt kolefni eins og það er til staðar í botnfellda skólpinu, eða eins og því er bætt í það, við upphaf loftunartímabilsins (mg/lítra),

C_t = styrkur uppleysts, lífræns kolefnis sem finnst í floti prófunarinnar við lok loftunartímabilsins (mg/lítra),

C_c = styrkur uppleysts, lífræns kolefnis sem finnst í floti samanburðarins við lok loftunartímabilsins (mg/lítra).

Lífniðurbrot er skilgreint í þessari aðferð sem brotthvarf lífræna kolefnisins. Lífniðurbrotið er hægt að gefa upp sem:

1. Hundraðshluti fjarlægingar, D_{da}, af því magni efnis sem bætt er við daglega:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

þar sem

D_{da} = niðurbrot/dagleg viðbót.

2. Hundraðshluti fjarlægingar, D_{ssd}, af því magni efnis sem er fyrir hendi í upphafi hvers dags:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

þar sem

D_{ssd} = niðurbrot/efni í upphafi dags;

merkin i og (i + 1) vísa til þess dags sem mæling er gerð.

Mælt er með jöfnu 2 a ef uppleyst, lífrænt kolefni (DOC) í frárennsli er breytilegt frá degi til dags en jöfnu 2 b má nota ef uppleyst, lífrænt kolefni í frárennsli helst hlutfallslega stöðugt frá degi til dags.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Þegar nýtt efni er rannsakað geta viðmiðunarefni í sumum tilvikum verið gagnleg; hins vegar er hér ekki mælt með neinu tilteknu viðmiðunarefni.

Gögn um nokkur efnasambönd metin í hringprófunum eru lögð fram (sjá 1. viðbæti) aðallega til að hægt sé að kvarða aðferðina öðru hvoru og til að gera mögulegan samanburð á niðurstöðum þegar önnur aðferð er notuð.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Virk seyra frá skólphreinsistöð er sett í hálfsamfellda einingu fyrir virka seyru (SCAS). Prófunarefnasambandinu og botnfelldu heimilisskólpi er bætt við og blandan loftblönduð í 23 klukkustundir. Lofblöndunin er síðan stöðvuð, seyran látin setjast og flotið fjarlægt.

Seyrunni sem eftir er í loftunarhólfinu er síðan blandað við annan deiliskammt af prófunarefnasambandinu og skólpi og hringurinn endurtekinn.

Lífniðurbrot er fundið með ákvörðun á uppleystu, lífrænu kolefnisinnihaldi flotsins. Það gildi er borið saman við það sem fékkst fyrir vökvann sem var tekinn úr samanburðaríláti sem aðeins botnfelldu skólpi var bætt í.

Þegar notuð er sértæk greiningaraðferð er hægt að mæla breytingar á styrk móðursameindarinnar vegna lífniðurbrots (frumlífbrjótanleiki).

1.5. GÆÐAVIÐMIÐANIR

Samanburðarnákvæmni þessarar aðferðar, byggð á fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis, hefur ekki verið ákvörðuð enn. (Þegar frumlífniðurbrot er til athugunar fást mjög nákvæm gögn fyrir efni sem verða fyrir umfangsmiklu niðurbroti).

Næmi aðferðarinnar ákvarðast að miklu leyti af breytileika blanksýnisins og í minni mæli af nákvæmni ákvörðunarinnar á uppleystu, lífrænu kolefni og styrk prófunarefnasambandsins í vökvanum við upphaf hvers hrings.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. *Efnablöndur*

Nægilegur fjöldi hreinna loftunareininga, en einnig má nota upphaflegu 1,5 lítra SCAS-prófunareininguna, og loftinntaksrör (mynd 1) eru sett saman fyrir hvert prófunarefni. Þrýstiloft sem leitt er í prófunareiningarnar er hreinsað með bómullarsíu og skal vera laust við lífrænt kolefni og mettað áður með vatni til að draga úr tapi vegna uppgufunar.

Sýni af blönduðum vökva, sem inniheldur 1 til 4 g af svifögnum í hverjum lítra, er fengið frá hreinsistöð með virkri seyru sem meðhöndlar aðallega heimilisskólp. Um það bil 150 ml af blandaða vökvanum þarf fyrir hverja loftunareiningu.

Stofnlausnir af prófunarefninu eru tilreiddar í eimuðu vatni; styrkurinn af lífrænu kolefni sem þarf er venjulega 400 mg/lítra en það gefur styrk prófunarefnasambands upp á 20 mg/lítra af kolefni við upphaf hvers loftunarhrings ef ekkert lífniðurbrot á sér stað.

Nota má hærri styrkleika ef eiturhrifin á örverur gefa færi á því.

Lífrænt kolefnisinnihald stofnlausnanna er mælt.

1.6.2. *Prófunarskilyrði*

Prófunina skal framkvæma við 20 til 25 °C.

Notuð er mikil þéttni loftháðra örvera (frá 1 til 4 g/lítra af svifögnum) og virkt tímabil kyrrsetningar er 36 klukkustundir. Kolefnisauðuga efnið í skólpinu verður fyrir umfangsmikilli oxun, venjulega innan átta klukkustunda eftir upphaf hvers loftunarhrings. Eftir það er innræn öndun í seyrunni það sem eftir er af loftunartímabilinu en á meðan er prófunarefnasambandið eina tiltæka hvarfefnið nema það breytist einnig greiðlega með efnaskiptum. Þessir eiginleikar, ásamt daglegri endursáningu í prófuninni ef heimilisskólp er notað sem miðill, veita mjög hagstæð skilyrði fyrir bæði aðlögun og umfangsmikið lífniðurbrot.

1.6.3. *Framkvæmd prófunarinnar*

Sýni er fengið af blönduðum vökva frá heppilegri hreinsistöð eða rannsóknarstofueiningu, sem aðallega meðhöndlar virka seyru frá heimilum, og haft við loftháðar aðstæður þar til það er notað á rannsóknarstofunni. Hver loftunareining sem og samanburðareiningin eru fylltar með 150 ml af blönduðum vökva (ef upprunalega SCAS-einingin er notuð skal margfalda uppgefið magn með 10) og loftunin gangsett. Eftir 23 klukkustundir er loftunin stöðvuð og seyran látin setjast í 45 mínútur. Kraninn á hverju íláti er opnaður hver á fætur öðrum og 100 ml skammtur af flotinu tekinn út. Sýni af botnfelldu heimilisskólpi er tekið rétt fyrir notkun og 100 ml bætt út í seyruna sem eftir er í hverri loftunareiningu. Loftun er gangsett aftur. Á þessu stigi er engu prófunarefni bætt við og eingöngu sett heimilisskólp í einingarnar þar til tært flot fæst við botnfellingu. Þetta tekur venjulega allt að tvær vikur en á þeim tíma nálgast uppleyst, lífrænt kolefni í flotinu, við lok hvers loftunarhrings, stöðugt gildi.

Í lok þessa tímabils er botnfelldu seyrunum, hverri um sig, blandað saman og 50 ml af samsettu seyrunni sem til verður er bætt í hverja einingu.

95 ml af botnfelldu skólpi og 5 ml af vatni er bætt í samanburðareiningarnar og 95 ml af botnfelldu skólpi auk 5 ml af viðeigandi stofnlausn af prófunarefnasambandi (400 mg/lítra) er bætt í prófunareiningarnar. Loftun er gangsett að nýju og haldið áfram í 23 klukkustundir. Seyran er síðan látin setjast í 45 mínútur og flotið dregið ofan af og uppleyst, lífrænt kolefnisinnihald í henni greint.

Framangreint, lotuvirkt verkferli er endurtekið daglega allan prófunartíann.

Fyrir botnfellingu getur verið nauðsynlegt að hreinsa veggi einingarinnar til að hindra uppsöfnun fastra efna fyrir ofan vökvalínuna. Sér skafa eða bursti er notaður fyrir hverja einingu til að hindra víxlmengun.

Æskilegast er að uppleyst, lífrænt kolefni í flotinu sé ákvarðað daglega, þó að heimilt sé að hafa lengra á milli greininga. Fyrir greiningu eru vökvarnir síaðir í gegnum þvegna 0,45 μm himnusíu eða skildir í skilvindu. Himnusíur henta ef tryggt er að þær gefi hvorki frá sér kolefni né frásogi efnið í síunarþrepinu. Hitastig sýnisins má ekki fara yfir 40 °C meðan það er í skilvindunni.

Lengd prófunarinnar fyrir efnasambönd sem sýna lítið eða ekkert lífniðurbrot er óákveðin en reynslan bendir til að hún ætti almennt að vera minnst 12 vikur, en ekki lengri en 26 vikur.

2. GÖGN OG MAT

Gildin fyrir uppleyst, lífrænt kolefni í floti prófunareininganna og samanburðareininganna eru teiknuð upp á móti tíma.

Eftir því sem lífniðurbroti vindur fram nálgast gildið, sem fæst í prófuninni, það sem fæst hjá samanburðinum. Þegar munurinn milli þessara tveggja gilda er stöðugur yfir þrjár mælingar í röð eru gerðar nægilega margar mælingar í viðbót til að hægt sé að nota tölfræðilega úrvinnslu fyrir gögnin og hundraðshluti lífniðurbrots prófunarefnasambandsins reiknað út (D_{da} eða D_{ssd}, sjá lið 1.2).

3. SKÝRSLUGJÖF

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni, eftir því sem við verður komið:

— allar upplýsingar um hvernig skólpið er, gerð eininga sem notaðar eru og tilraunaniðurstöður viðkomandi prófunarefninu, viðmiðunarefninu ef slíkt er notað og blanksýninu,

— hitastigið,

— ferill fjarlægingarinnar með lýsingu, aðferð við útreikning (sjá lið 1.2),

— dagsetning og staður þar sem virkri seyru og skólpi var safnað, staða aðlögunar, styrkur, o.s.frv.,

— vísindalegur rökstuðningur fyrir öllum breytingum á prófunaraðferð,

— undirskrift og dagsetning.

3.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Þar eð efnin sem á að prófa með þessari aðferð munu ekki vera auðlífbrjótanleg verður allt brotthvarf uppleysts, lífræns kolefnis (DOC), sem er eingöngu vegna lífniðurbrots, smám saman á dögum eða vikum, nema í þeim tilvikum þar sem aðlögun er hröð eins og sést af skyndilegu brotthvarfi sem verður eftir einhverjar vikur.

Hins vegar getur eðlisefnafræðilegt ásog stundum leikið mikilvægt hlutverk; vísbending um það er þegar fullkomin fjarlæging eða fjarlæging að hluta til á viðbættu uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) kemur fram strax í upphafi. Hvað síðan gerist er háð þáttum eins og umfangi ásogs og styrk svifagna í frárennslinu sem er hent. Venjulega eykst munurinn milli styrksins á uppleystu, lífrænu kolefni (DOC) í samanburðar- og prófunarflotinu smátt og smátt frá upphaflegu lágu gildi og þessi munur helst síðan við nýja gildið það sem eftir er af tilrauninni, nema aðlögun eigi sér stað.

Frekari prófanir eru nauðsynlegar ef gera á greinarmun á milli lífniðurbrots (eða lífniðurbrots að hluta til) og ásogs. Það er hægt að gera á ýmsa vegu en mest sannfærandi er að nota flotið, eða seyru sem sáð, í prófun með grunnuppsetningu (helst öndunarprófun).

Líta skal á prófunarefni sem mögulega lífbrjótanleg ef þau sýna mikla fjarlægingu uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) án ásogs í þessari prófun. Fjarlæging að hluta til, án ásogs, bendir til þess að efnið sé a.m.k. lífniðurbrjótanlegt að einhverju leyti.

Lítil eða engin fjarlæging uppleysts, lífræns kolefnis (DOC) getur stafað af því að prófunarefnið hefur hamlandi áhrif á örverurnar og þetta getur einnig komið fram sem sundrun og tap á seyru, sem hefur í för með sér gruggugt flot. Endurtaka skal prófunina með minni styrk prófunarefnisins.

Notkun sértækrar greiningaraðferðar eða ^{14}C-merkts prófunarefnis getur veitt meiri næmleika. Ef notað er ^{14}C prófunarefnasamband er það endurheimtin á $^{14}CO_2$ sem staðfestir að lífniðurbrot hafi átt sér stað.

Þegar niðurstöður eru einnig settar fram sem frumlífniðurbrot skal, ef mögulegt er, gefa skýringu á þeirri breytingu á efnafræðilegri byggingu sem leiðir til þess að svörun upprunaprófunarefnisins tapast.

Gefa þarf upp fullgildingu greiningaraðferðarinnar ásamt svöruninni sem kom fram í blankprófunar-miðlinum.

4. HEIMILDIR

1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

1. viðbætir

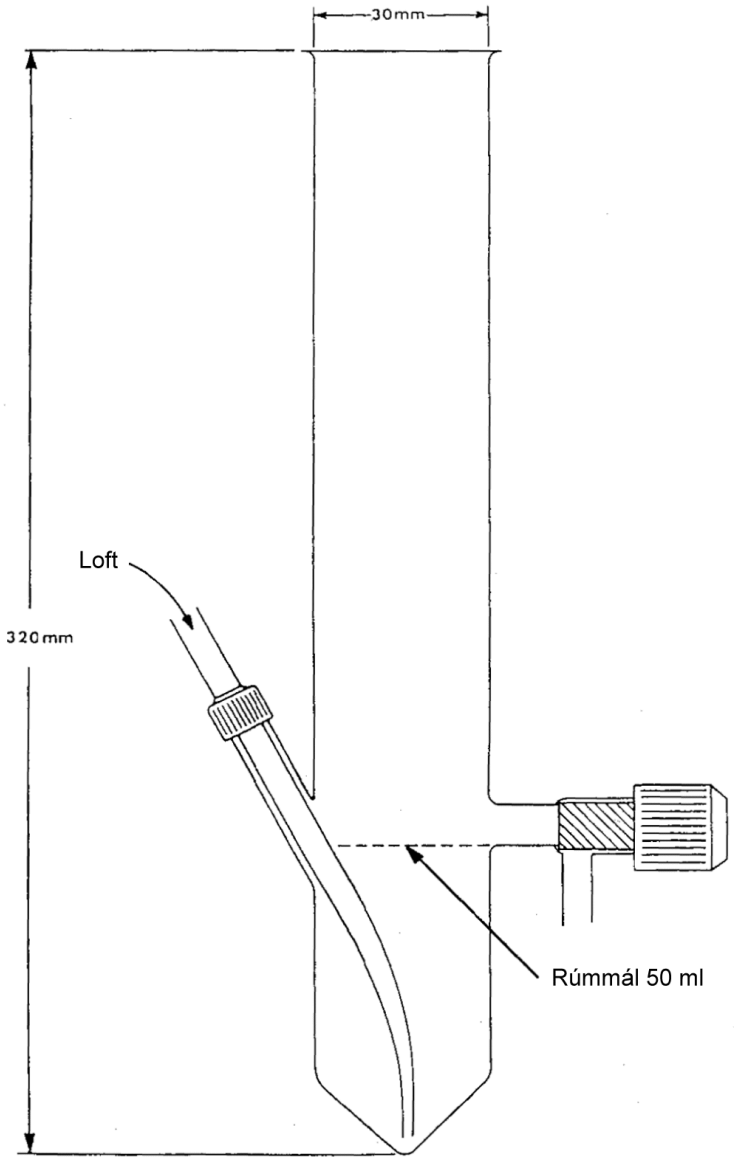
SCAS-prófun: dæmi um niðurstöður

Efni	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	hundraðshluti lífniðurbrots, D_{da}	Tímalengd prófunar (dagar)
4-asetýlamínóbensensúlfónat	17,2	2,0	85	40
tetraprópýlenbensensúlfónat	17,3	8,4	51,4	40
4-nítrófenól	16,9	0,8	95,3	40
díetýlenglýkól	16,5	0,2	98,8	40
anilín	16,9	1,7	95,9	40
sýklópentantetrakarboxýlat	17,9	3,2	81,1	120

2. viðbætir

Dæmi um prófunarbúnað

Mynd 1



C.13 LÍFÞÉTTNI GEGNUMSTREYMISPRÓFUN Á FISKUM

1. AÐFERÐ

Þessi lífþéttniaðferð er eins og í OECD-viðmiðunarreglu 305 um prófanir (1996).

1.1. INNGANGUR

Í þessari aðferð er lýst tilhögun við að lýsa lífþéttnimætti efna í fiski við gegnumstreymi. Þótt gegnumstreymisprófanir séu æskilegastar er heimilt að nota hálfkyrrstöðuprófanir svo fremi þær uppfylli gildisviðmiðanirnar.

Aðferðin er nægilega nákvæm til að hægt sé að framkvæma prófunina en jafnframt er svigrúm fyrir aðlögun á tilraunatilhöguninni með hliðsjón af skilyrðum á tilteknum rannsóknarstofum og mismunandi eiginleikum prófunarefna. Gildi aðferðarinnar er mest ef hún er notuð fyrir stöðug, lífræn efnasambönd með log P_{ow}-gildi milli 1,5 og 6,0 (1. heimild), en hana má einnig nota fyrir mjög fitusækin efni (með log P_{ow} > 6,0). Fyrir fram áætlaði lífþéttnistuðullinn (BCF), stundum táknaður K_B, fyrir mjög fitusækin efni af því tagi verður að öllum líkindum hærri en gildi þess lífþéttnistuðuls fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}) sem vænta má að fáist við tilraunir á rannsóknarstofu. Fyrir fram áætlaðan lífþéttnistuðull fyrir lífræn efnasambönd með log P_{ow}-gildi allt að 9,0 má fá með jöfnu Bintein og annarra (2. heimild). Þeir þættir sem lýsa lífþéttnimættinum eru m.a. fasti fyrir upptökuhraða (k_1), hreinsunarhraðafasti (k_2) og lífþéttnistuðull fyrir stöðugt ástand (BCF_{SS}).

Notkun geislamerktra prófunarefna getur auðveldað greiningu vatns- og fisksýna og þau er hægt að nota til að ákvarða hvort fram skuli fara sanngreining og mæling á niðurbrotsefnum. Ef geislavirkar heildarleifar eru mældar (t.d. með bruna eða með því að leysa upp vef) byggist lífþéttnistuðullinn á upprunaefnasambandinu, öllum umbrotsefnum sem eftir eru og einnig uppteknu kolefni. Því er ekki hægt að bera lífþéttnistuðla sem byggjast á geislavirkum heildarleifum beint saman við lífþéttnistuðul sem fæst með sértækri efnagreiningu á upprunaefnasambandinu einu.

Við rannsóknir með geislamerktum efnum er hægt að beita hreinsunaraðferðum til að ákvarða lífþéttnistuðul sem byggist á upprunaefnasambandinu og lýsa má eiginleikum helstu umbrotsefna ef það er talið nauðsynlegt. Einnig er unnt að tengja saman rannsóknir á efnaskiptum í fiski og lífþéttnirannsóknir með efnagreiningu og sanngreiningu leifanna í vefjunum.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Lífþéttni/uppsöfnun í lífverum er aukning á styrk prófunarefnis í eða á lífveru (tilteknum vefjum hennar), miðað við styrk prófunarefnisins í umhverfi hennar.

Lífþéttnistuðullinn (BFC eða K_B) er styrkur prófunarefnisins, allan tímann meðan á upptökufasa stendur, í eða á fiskinum eða tilteknum vefjum hans (C_f í µg/g (milljónarhlutum)), deilt með styrk íðefnisins í umhverfi hans (C_w í µg/ml (milljónarhlutum)).

Lífþéttnistuðullinn í stöðugu ástandi (BCF_{SS} eða K_B) tekur ekki umtalsverðum breytingum á löngu tímabili þar eð styrkur prófunarefnisins í umhverfinu helst stöðugur á tímabilinu.

Jafnvægi eða stöðugt ástand sést í ferlinum fyrir prófunarefni í fiski (C_f) á móti tíma þegar ferillinn verður samsíða tímaásnum og þrjár mælingar í röð á C_f í sýnum, sem eru tekin með að minnsta kosti tveggja daga millibili, gefa niðurstöður þar sem munur milli mælinga er innan við ± 20% og enginn marktækur munur er á sýnatökutímabilunum þremur. Þegar safnsýni eru greind þurfa hið minnsta fjórar greiningar að fara fram í röð. Ef upptaka prófunarefna er hæg er æskilegra að sjö dagar líði milli þess að sýni séu tekin.

Lífþéttnistuðull, sem er reiknaður beint frá hraðaföstum (k_1/k_2), kallast hraðafræðilegur þéttnistuðull, BCF_k.

Deilistuðull n-oktanóls-vatns (P_{ow}) er hlutfallið á milli leysni íðefnis í n-oktanóli og vatni við jafnvægi (aðferð A.8), einnig gefið upp sem K_{ow}. Logri P_{ow} er notaður sem vísbending um þá lífþéttni sem efni getur náð í lagarlífverum.

Váhrifa- eða upptökufasi er sá tími sem fiskurinn verður fyrir váhrifum af prófunaríðefninu.

Fastinn fyrir upptökuhraða (k_1) er tölugildi sem skilgreinir hraða hækkunar á styrk prófunaríðefnis í á prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) þegar fiskurinn er látinn vera í snertingu við efnið (k_1 er gefinn upp sem dagar^{-1}).

Fasinn eftir váhrif eða hreinsun (tap) er tíminn eftir að prófunarfiskurinn hefur verið fluttur úr miðli með prófunarefninu í miðil sem er laus við það efni, þegar hreinsun (eða hreint tap) efnisins úr prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) er rannsakað.

Fasti fyrir hreinsunar(tap)hraða (k_2) er tölugildi sem skilgreinir hraða lækkunar á styrk prófunarefnisins í prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) eftir að prófunarfiskurinn hefur verið fluttur úr miðli sem inniheldur prófunarefnið yfir í miðil sem er laus við það efni (k_2 er gefinn upp sem d^{-1}).

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Prófunin samanstendur af tveimur fösum: váhrifa(upptöku)fasanum og fasanum eftir váhrif (hreinsun). Meðan á upptökufasanum stendur eru aðskildir hópar fiska látnir verða fyrir váhrifum af prófunarefninu í a.m.k. tveimur styrkleikum. Þeir eru síðan fluttir í miðil sem er laus við prófunarefnið og þá hefst hreinsunarfasinn. Hreinsunarfasi er ávallt nauðsynlegur nema upptaka efnisins í upptökufasanum hafi verið óveruleg (t.d. ef lífþéttnistuðullinn er lægri en 10). Fylgst er með styrk prófunarefnisins í/á fiskinum (eða tilteknum vefjum hans) í báðum fösum prófunarinnar. Auk þess að hafa tvo mismunandi styrkleika er samanburðarhópur fiska jafnframt hafður við aðstæður sem eru eins nema án prófunarefnisins, til að tengja hugsanleg, skaðleg áhrif í lífþéttniprófuninni við samsvarandi samanburðarhóp og ákvarða bakgrunnsstyrk prófunarefnisins.

Upptökufasinn varir í 28 daga nema sýnt hafi verið fram á að jafnvægi hafi náðst fyrr. Út frá jöfnunni í 3.viðbæti má spá fyrir um lengd upptökufasans og hversu langur tími líður þar til stöðugt ástand er komið á. Hreinsunarfasinn hefst síðan þegar fiskurinn er fluttur í annað hreint ker með sama miðli en án prófunarefnisins. Ef unnt er skal reikna lífþéttnistuðulinn bæði sem hlutfallið (BCF_{SS}) á milli styrksins í fiskinum (C_f) og vatninu (C_w) við sýnilegt, stöðugt ástand og sem stuðul fyrir hraða lífþéttni (BCF_k) sem er hlutfallið á milli hraðafastanna fyrir upptöku (k_1) og hreinsun (k_2) þar sem gengið er út frá hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef augljóst er að hraðafræðin er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (5. viðbætir).

Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga skal framlengja upptökufasann þar til það hefur náðst, þó ekki lengur en í 60 daga, og síðan hefst hreinsunarfasinn.

Fasti fyrir upptökuhraða, hreinsunar(tap)hraða (eða fleiri en einn fasti, ef önnur flóknari líkön eiga í hlut), lífþéttnistuðullinn og, ef unnt er, öryggismörk fyrir hvern og einn þessara mæliþátta eru reiknuð út frá því líkani sem lýsir best mældum styrkleikum prófunarefnisins í fiskinum og vatninu.

Lífþéttnistuðullinn er gefinn sem fall af heildarblautvigt fisksins. Í sérstökum tilvikum má þó nota tiltekna vefi eða líffæri (t.d. vöðva, lifur), ef fiskurinn er nægilega stór, eða skipta má fiskinum í ætan hluta (flak) og óætan hluta (innyfli). Fyrir mörg lífræn efni eru skýr tengsl milli lífþéttnimáttarins og fitusækni efnisins og því eru samsvarandi tengsl milli fituefnainnihalds prófunarfiskanna og mældrar lífþéttni þessara efna. Til að draga úr breytileika af þessum toga í niðurstöðum prófana fyrir mjög fitusækin efni (þ.e. með log P_{ow} > 3) skal því gefa lífþéttnina bæði í hlutfalli við fituefnainnihaldið og í hlutfalli við heildarlíkamsþyngdina.

Ákvarða skal fituefnainnihaldið út frá sama líffræðilega efni og notað er til að ákvarða styrk prófunarefnisins, verði því við komið.

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið skulu liggja fyrir áður en prófun er gerð vegna lífþéttni:

— vatnsleysni,

— deilistuðull oktanóls-vatns, P_{ow} (einnig gefinn sem K_{ow}, ákvarðaður með háþrýstivökvaskiljun í A.8),

— vatnsrof,

— ljósummyndun í vatni, ákvarðað í sól eða með sólargeislunarhermun og við sömu geislunarskilyrði og ríkja í lífþéttniprófuninni (3. heimild),

— yfirborðsspenna (þ.e. fyrir efni sem ekki er unnt að ákvarða log P_{ow} fyrir),

— gufuþrýstingur,

— auðlífbrjótanleiki (eftir atvikum).

Aðrar nauðsynlegar upplýsingar varða eiturhrif á þá fisktegund sem á að nota í prófuninni, einkum aðfellda miðgildisbanastyrkinn LC_{50} (þ.e. óháðan tíma). Viðeigandi greiningaraðferð með þekktri nákvæmni, samkvæmni og næmi til að ákvarða magn prófunarefnisins í prófunarlausnunum og í líffræðilega efninu skal vera fyrir hendi ásamt upplýsingum um tilreiðslu og geymslu sýnisins. Einnig skulu greiningarmörk prófunarefnisins í bæði vatni og fiskvefjum vera þekkt. Ef notað er geislamerkt prófunarefni (^{14}C) skal það hlutfall geislavirkni sem tengist óhreinindum vera þekkt.

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin telst gild ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

— hitastigsfrávikið er minna en ± 2 ºC,

— styrkur uppleysts súrefnis fer ekki undir 60% mettun,

— styrkur prófunarefnisins í hólfunum skal vera ± 20% af meðaltali mældra gilda í upptökufasanum,

— dánartíðni og önnur skaðleg áhrif/sjúkdómar í bæði samanburðarfiski og meðhöndluðum fiski eru undir 10% við lok prófunarinnar; þegar prófunin nær yfir margar vikur eða mánuði skulu dauði og önnur skaðleg áhrif í báðum settunum af fiskum vera undir 5% á mánuði og ekki fara yfir 30% í heild.

1.6. VIÐMIÐUNAREFNASAMBÖND

Notkun viðmiðunarefnasambanda með þekktum lífþéttnimætti getur, ef með þarf, komið að gagni við eftirlit með tilhögun tilraunarinnar. Enn er þó ekki unnt að mæla með neinum tilteknum efnum.

1.7. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.7.1. *Búnaður*

Að því er varðar alla hluta búnaðarins skal forðast að nota efni sem kunna að leysast upp, í- eða ásogast eða útskolast og hafa skaðleg áhrif á tilraunadýrin. Hægt er að nota stöðluð rétthyrnd eða sívöl ílát, gerð úr efnafræðilega óvirku efni og af viðeigandi stærð, í samræmi við hleðsluhlutfall. Halda skal notkun mjúkra plaströra í lágmarki. Æskilegast er að nota teflon®, ryðfrítt stál og/eða glerrör. Að því er varðar efni með háan ásogsstuðul, s.s. tilbúin pýretróíð, hefur reynslan leitt í ljós að nauðsynlegt getur verið að nota sílanhúðað gler. Í slíkum tilvikum verður að fleygja búnaðinum að lokinni notkun.

1.7.2. *Vatn*

Náttúrulegt vatn er að jafnaði notað við prófunina og skal fengið úr ómengaðri uppsprettu með jöfnum gæðum. Þynningarvatnið skal vera með þeim gæðum að fiskur af völdu tegundinni lifi af aðlögunar- og prófunartímann og að ekki komi fram hjá honum nein óeðlileg einkenni í útliti eða atferli. Helst skal vera unnt að sýna fram á að prófunartegundin geti lifað, vaxið og æxlast í þynningarvatninu (t.d. í

rannsóknarstofueldi eða prófun á eiturhrifum á lífsferil). Eiginleikum vatnsins skal lýst, a.m.k. að því er varðar sýrustig, hörku, heildarmagn fastra efna, heildarmagn lífræns kolefnis og helst líka að því er varðar ammóníum, nítrít og basavirkni og seltu ef um sjávartegundir er að ræða. Þótt það sé vel þekkt hvaða þættir eru mikilvægir til að fiskurinn þrífist vel er að finna í 1. viðbæti ráðlagða hámarksstyrkleika ýmissa efnaþátta vegna ferskvatns og sjós.

Gæði vatns skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildið skal vera á bilinu 6,0 til 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig. Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunarefninu) eða að það hafi ekki skaðleg áhrif á fiskinn skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Ákvörðun á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), varnarefnum (t.d. heildarmagn fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna skal gerð t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að vatnsgæði hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálli (t.d. á sex mánaða fresti).

Náttúrlegt innihald agna og heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) í þynningarvatninu skal vera sem minnst til að forðast að lífrænt efni sogi á sig prófunarefnið en það gæti skert lífaðgengi prófunarefnisins (4. heimild). Hámarks viðunandi gildi er 5 mg/l fyrir efnisagnir (þurrefni sem kemst ekki gegnum 0,45 µm síu) og 2 mg/l fyrir heildarmagn lífræns kolefnis (sjá 1.viðbæti). Vatnið skal síað fyrir notkun ef þörf krefur. Sú hlutdeild lífræns kolefnis í vatninu, sem rekja má til prófunarfisksins (úrgangsefni) og fæðuleifa, skal vera sem minnst. Í allri prófuninni skal styrkur lífræns kolefnis í prófunarkerinu ekki fara meira yfir styrk lífræns kolefnis, sem á upptök sín í prófunarefninu og uppleysandi efninu ef slíkt er notað, en sem nemur 10 mg/l (± 20%).

1.7.3. *Prófunarlausnir*

Stofnlausn prófunarefnisins er tilreidd í hæfilegum styrk. Heppilegast er að tilreiða stofnlausnina með því að prófunaríðefninu sé einfaldlega blandað, eða það sé hrist, saman við þynningarvatnið. Ekki er mælt með notkun leysa eða dreifiefna (uppleysandi efna); í tilteknum tilvikum getur það þó gerst til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika Leyfileg leysiefni eru etanól, metanól, etýlenglýkólmónómetýletri, etýlenglýkóldí-metýletri, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól. Leyfileg dreifiefni eru Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% metýlsellulósi og HCO-40. Gæta skal varúðar ef notuð eru auðlífbrjótanleg efni þar eð þau geta skapað vanda vegna bakteríuvaxtar í gegnumstreymisprófunum. Prófunarefnin geta verið geislamerkt og skulu vera með mesta hreinleika sem völ er á (t.d. helst > 98%).

Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunarefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað, mettunarkerfi) til að flytja styrkleikana í prófunarhólfin. Helst skal skipta a.m.k. fimm sinnum á dag um vökva í hverju prófunarhólfi. Gegnumstreymiskerfið er æskilegast en ef ekki er unnt að nota það (t.d. ef það skaðar prófunarlífverur) má nota hálfkyrrstöðutækni, að því tilskildu að gildisviðmiðanir séu uppfylltar. Streymi stofnlausna og þynningarvatns skal athugað 48 klst. fyrir prófun og síðan a.m.k. daglega í prófuninni. Í þessari athugun felst ákvörðun á streyminu í hverju prófunarhólfi og að tryggt sé að frávik í streyminu sé ekki meira en 20% í hverju hólfi um sig eða milli hólfa.

1.7.4. *Val á tegund*

Mikilvægar viðmiðanir við val á tegund eru að hún sé auðfáanleg, fáist í hæfilegri stærð og auðvelt sé að ala hana í rannsóknarstofunni. Aðrar viðmiðanir við val á fisktegund eru afþreyingar- eða viðskiptagildi og hvort hún er vistfræðilega mikilvæg, svo og sambærilegt næmi og góð reynsla af henni.

Í 2. viðbæti eru tilgreindar prófunartegundir sem mælt er með. Nota má aðrar tegundir en vera má að breyta þurfi tilhögun prófunarinnar svo að prófunarskilyrði verði við hæfi. Færa skal rök fyrir vali tegundarinnar og tilraunaaðferðarinnar í slíkum tilvikum.

1.7.5. *Eldi fisksins*

Stofnþýði fisks er látið aðlagast í tvær vikur hið minnsta í vatni við prófunarhitann og allan tímann gefið nægilegt fæði sem er sömu tegundar og á að nota í prófuninni.

Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánartíðni og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:

— dánartíðni hærri en 10% af þýðinu á sjö dögum: hafna skal allri lotunni,

— dánartíðni milli 5 og 10% af þýðinu á sjö dögum: aðlögun skal standa sjö daga í viðbót,

— dánartíðni er undir en 5% af þýðinu á sjö dögum: lotan er ásættanleg – ef dánartíðnin er hærri en 5% á næsta sjö daga tímabili: hafna skal allri lotunni.

Gengið skal úr skugga um að fiskur, sem er notaður í prófununum, sé laus við sjáanlega sjúkdóma og afbrigðileika. Fjarlægja skal allan sjúkan fisk. Fiskurinn skal ekki fá meðhöndlun við sjúkdómi í tvær vikur fyrir prófunina eða meðan prófun varir.

1.8. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.8.1. *Forprófun*

Gagnlegt getur verið að framkvæma forprófun til að finna bestu skilyrði í endanlegu prófuninni, t.d. velja mismunandi styrk prófunarefnis og lengd upptöku- og hreinsunarfasanna.

1.8.2. *Váhrifaskilyrði*

1.8.2.1. Lengd upptökufasa

Spá má fyrir um lengd upptökufasans út frá fenginni reynslu (t.d. úr fyrri rannsókn eða með efni sem hefur tengda uppsöfnunareiginleika) eða með tilteknum reynslutengslum (e. *empirical relationships*) byggðum á þekkingu á annað hvort vatnsleysanleika prófunarefnisins eða deilistuðli oktanóls/vatns fyrir það (sjá 3. viðbæti).

Upptökufasinn skal vara í 28 daga nema sýna megi fram á að jafnvægi hafi náðst fyrr. Ef stöðugt ástand hefur ekki náðst innan 28 daga skal framlengja upptökufasann og halda mælingum áfram þar til það hefur náðst, þó ekki lengur en í 60 daga.

1.8.2.2. Lengd hreinsunarfasa

Tími sem samsvarar hálfri lengd upptökufasans nægir venjulega til að það verði hæfileg minnkun á líkamsálagi af prófunarefninu (t.d. 95%) (sjá leiðbeiningar um matið í 3. viðbæti). Ef sá tími sem líður þar til magnið hefur minnkað um 95% er óheppilega langur, t.d. tvöfalt lengri en eðlilegur upptökufasi (þ.e. lengri en 56 dagar), má stytta tímann (þ.e. þar til styrkur prófunarefnisins er innan við 10 % af styrknum við stöðugt ástand). Ef efni hafa flóknara mynstur að því er varðar upptöku og hreinsun en kemur fram í eins hólfs fisklíkani, með hraðafræði af fyrstu gráðu, skal hins vegar lengja hreinsunarfasann til að ákvarða fastana fyrir hraða taps. Lengd tímabilsins getur hins vegar ráðist af lengd þess tímabils þegar styrkur prófunarefnisins í fisknum er yfir greiningarmarkinu.

1.8.2.3. Fjöldi prófunarfiska

Fyrir hvern prófunarstyrk eru valdir svo margir fiskar að fyrir hverja prófun séu tiltækir minnst fjórir fiskar við hverja sýnatöku. Ef krafist er meiri tölfræðilegs styrks verður að fjölga fiskum í hverri prófun.

Ef um fullvaxna fiska er að ræða skal tilgreina hvort í tilrauninni eru notaðir hængar eða hrygnur eða bæði hængar og hrygnur. Ef bæði kyn eru notuð skal skjalfest að munurinn á fituefnainnihaldi kynjanna sé ekki marktækur áður en váhrifin hefjast; nauðsynlegt getur verið að hópa alla karlfiska og alla kvenfiska.

Í hverri prófun skal velja saman fiska af svipaðri stærð þannig að þyngd þeirra smæstu sé aldrei undir tveimur þriðju af þyngd þeirra stærstu. Allir skulu vera af sama árgangi og uppruna. Þar eð þyngd og aldur fisks virðist í sumum tilvikum ráða miklu um gildi lífþéttnistuðulsins (1. heimild) skal skrá upplýsingar þar að lútandi nákvæmlega. Æskilegt er að undirsýni fiskstofnsins séu vigtuð fyrir prófunina til að áætla meðalþyngdina.

1.8.2.4. Hleðsla

Nota skal mikið vatn í hlutfalli við fisk til að lágmarka minnkun á C_w sem verður þegar fisknum er bætt við í upphafi prófunarinnar og einnig til að forðast að styrkur uppleysts súrefnis minnki. Mikilvægt er að hleðsluhlutfallið hæfi þeirri prófunartegund sem er notuð. Í öllum tilvikum er mælt með því að

hleðsluhlutfallið sé að jafnaði 0,1–1 ,0 g fisks (blautvigt) fyrir hvern lítra vatns á dag. Hleðsluhlutföll mega vera há ef sýnt er fram á að unnt sé að halda nauðsynlegum styrkleika prófunarefnisins innan ± 20% marka og að styrkur uppleysts súrefnis fari ekki undir 60% mettun.

Við val á hæfilegu hleðslufyrirkomulagi skal taka tillit til eðlilegs búsvæðis fisktegundarinnar. Þannig getur t.d. botnfiskur þurft stærra botnsvæði í kerinu, miðað við tiltekið vatnsmagn, en sá fiskur sem heldur sig að ofar í vatninu.

1.8.2.5. Fóðrun

Á aðlögunar- og prófunartímabilunum er fiskurinn fóðraður á viðeigandi fóðri með þekktu fitu- og heildarprótíninnihaldi og í þeim mæli að hann haldist heilbrigður og haldi líkamsþyngd sinni. Fiskurinn er fóðraður daglega yfir aðlögunar- og prófunartímabilin með magni sem er u.þ.b. 1 til 2% af líkamsþyngd á dag; þetta heldur styrk fituefna tiltölulega stöðugum í flestum fisktegundum meðan á prófuninni stendur. Magn fóðurs skal endurreiknað t.d. vikulega, til að halda líkamsþyngdinni og fituefnainnihaldinu stöðugu. Við þessa útreikninga má áætla þyngd fisksins í hverju prófunarhólfi út frá þyngd fiska úr sama hólfi sem síðast voru tekin sýni úr. Ekki skal vigta þann fisk sem eftir er í því hólfi.

Daglega og skömmu eftir fóðurgjöf (að liðnum 30–60 mín.) skal sjúga burtu óétið fóður og saur úr prófunarhólfunum. Hólfum skal haldið svo hreinum sem framast er unnt alla prófunina þannig að styrkur lífræns efnis sé ávallt í lágmarki þar eð tilvist lífræns kolefnis getur dregið úr lífaðgengi prófunarefnisins (1. heimild).

Margar tegundir fóðurs eru unnar úr fiskimjöli og því skal efnagreina fóðrið með tilliti til prófunarefnisins. Einnig er æskilegt að efnagreina fóðrið með tilliti til varnarefna og þungmálma.

1.8.2.6. Ljós og hiti

Ljóslotan er að öllu jöfnu 12 til 16 klst. og hitastigið (± 2 °C) skal henta viðkomandi prófunartegund (sjá 2. viðbæti). Tegund og einkenni lýsingar skulu vera þekkt. Taka skal tillit til þess að prófunarefnið getur orðið fyrir ljósummyndun við þau ágeislunarskilyrði sem eru notuð í rannsókninni. Nota skal viðeigandi lýsingu til að varna því að fiskurinn verði fyrir váhrifum af völdum óeðlilegra ljósefnafræðilegra myndefna. Í sumum tilvikum getur verið heppilegt að nota síu til að útiloka útfjólubláa geislun sem er undir 290 nm.

1.8.2.7. Prófunarstyrkleikar

Í gegnumstreymistilrauninni er fiskurinn látinn verða fyrir váhrifum af prófunarefninu í vatninu í a.m.k. tveimur styrkleikum. Meiri (eða mesti) styrkur prófunarefnisins skal að jafnaði valinn þannig að hann sé u.þ.b. 1% af þröngt aðfelldum miðgildisbanastyrknum LC_{50} og a.m.k. tíu sinnum meiri en greiningarmörk þess í vatni með þeirri greiningaraðferð sem notuð er.

Einnig má ákvarða mesta prófunarstyrk með því að deila í LC_{50} eftir 96 klst. með viðeigandi hlutfalli bráðra/langvinnra eiturhrifa (viðeigandi hlutföll geta verið um 3 og upp í 100 fyrir sum íðefni). Ef mögulegt er skal velja annan eða aðra styrkleika þannig að munurinn á þeim sé með tugaþrepamillibili. Ef þetta er ógerlegt vegna viðmiðunarinnar um 1% af LC_{50}, og vegna greiningarmarkanna, má nota lægra þrepamillibil en 10 eða meta skal hvort nota skuli ^{14}C-merkt prófunarefni. Enginn styrkleiki, sem er notaður, skal vera meiri en sem nemur leysni prófunarefnisins.

Ef uppleysandi efni er notað skal styrkur þess ekki vera meiri en 0,1 ml/l og hann ætti að vera sá sami í öllum prófunarkerjum. Hlutdeild þess og prófunarefnisins í heildarinnihaldi lífræns kolefnis í prófunarvatninu skal vera þekkt. Þó skal forðast notkun slíkra efna í lengstu lög.

1.8.2.8. Samanburður

Með prófunarröðinni skal hafa eitt samanburðarker með þynningarvatni eða, ef við á, eitt samanburðarker með uppleysandi efninu, svo fremi að staðfest hafi verið að efnið hafi engin áhrif á fiskinn. Hafi það ekki verið gert skal framkvæma báðar samanburðarprófanirnar.

1.8.3. *Tíðni mælinga á vatnsgæðum*

Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, heildarmagn lífræns kolefnis (TOC), sýrustig og hita í öllum kerjum. Mæla skal heildarhörku og seltu, ef við á, í samanburðarprófunum og í einu keri þar sem styrkurinn er meiri (eða mestur). Uppleyst súrefni og selta, ef við á, skulu mæld að lágmarki þrisvar

sinnum – í upphafi, í miðri prófuninni og við lok upptökutímabilsins – og vikulega á hreinsunartímabilinu. Heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) skal mælt í upphafi prófunar (24 og 48 klst. áður en upptökufasinn hefst) áður en fiskurinn er settur út í og að a.m.k. vikulega, bæði í upptöku- og hreinsunarfösum. Hiti skal mældur daglega, sýrustig í upphafi og við lok hvers tímabils og harka einu sinni í hverri prófun. Æskilegt er að vakta hitann stöðugt í a.m.k. einu keri.

1.8.4. *Sýnataka og greining á fiski og vatni*

1.8.4.1. Áætlun um töku fisk- og vatnssýna

Vatnssýni úr prófunarhólfunum eru tekin til að ákvarða styrk prófunarefnisins áður en fiskurinn er settur út í og bæði í upptöku- og hreinsunarfasa. Vatnssýni eru a.m.k. tekin um leið og sýni af fiskinum og áður en fóðrun fer fram. Styrkleikar prófunarefnisins eru ákvarðaðir í upptökufasanum til að kanna samræmi við gildisviðmiðanirnar.

Sýni af fiski eru tekin a.m.k. fimm sinnum í upptökufasanum og a.m.k. fjórum sinnum í hreinsunarfasanum. Í sumum tilvikum verður erfitt að meta gildi lífþéttnistuðulsins af einhverri nákvæmni út frá þessum sýnafjölda, einkum ef vísbendingar eru um að hraðafræði hreinsunar sé ekki af fyrstu gráðu, og því getur verið skynsamlegt að taka sýni oftar í báðum fösum (sjá 4. viðbæti). Viðbótarsýnin skulu geymd og aðeins greind ef niðurstöður fyrstu umferðarinnar í greiningum reynast ekki nægja til að unnt sé að reikna lífþéttnistuðulinn út með tilætlaðri nákvæmni.

Dæmi um viðunandi sýnatökuáætlun er að finna í 4. viðbæti. Auðvelt er að reikna út aðrar áætlanir með því að nota önnur gefin gildi fyrir P_{ow} við útreikninga á váhrifatíma fyrir 95% upptöku.

Sýni eru tekin áfram í upptökufasanum þar til stöðugt ástand næst, þó ekki lengur en í 28 daga. Ef stöðugt ástand næst ekki innan 28 daga skal halda áfram að taka sýni þar til það næst, þó ekki lengur en í 60 daga. Fiskurinn skal fluttur í hrein ker áður en hreinsunarfasinn hefst.

1.8.4.2. Sýnataka og undirbúningur sýnis

Vatnssýni til greiningar eru tekin t.d. með því að sjúga upp vatnið með hvarftregu röri úr miðju prófunarhólfsins. Þar eð hvorki síun né skiljun í skilvindu virðast skilja þann hluta prófunarefnisins sem er ekki lífaðgengilegur frá þeim sem er lífaðgengilegur (á einkum við um mjög fitusækin efni, þ.e. íðefni sem hafa log $P_{ow} > 5$) (1. og 5. heimild), skulu sýni ekki meðhöndluð þannig.

Þess í stað skulu gerðar ráðstafanir til að halda ílátunum svo hreinum sem framast er unnt og fylgjast skal með heildarmagni lífræns kolefnis bæði í upptöku- og hreinsunarfösunum.

Hæfilegur fjöldi fiska (að jafnaði ekki færri en fjórir) eru teknir úr prófunarhólfinu við hverja sýnatöku. Fiskarnir í sýninu eru skolaðir snöggt með vatni, þerraðir og aflífaðir strax með mannúðlegustu og heppilegustu aðferð sem völ er á og síðan vigtaðir.

Æskilegt er að efnagreiningar á fiski og vatni fari fram strax að sýnatöku lokinni til að koma í veg fyrir niðurbrot eða annað tap og til að reikna út áætlaðan upptöku- og útskilnaðarhraða eftir því sem prófuninni miðar. Ef greiningar eru gerðar þegar í stað er einnig hægt að koma í veg fyrir seinkaða ákvörðun á því að jafnvægi hafi náðst.

Ef greining er ekki gerð strax skal geyma sýni með viðeigandi aðferð. Afla skal upplýsinga um viðeigandi geymsluaðferð fyrir tiltekna prófunarefnið — t.d. djúpfrystingu, geymslu við 4 °C, lengd geymslu, útdráttaraðferðir o.s.frv. — áður en rannsóknin hefst.

1.8.4.3. Gæði greiningaraðferðar

Þar eð öll aðferðin ræðst í meginatriðum af nákvæmni, samkvæmni og næmi þeirrar greiningaraðferðar sem er notuð fyrir prófunarefnið skal kanna með tilraunum hvort samkvæmni og samanburðarnákvæmni efnagreiningarinnar, svo og endurheimt prófunarefnisins úr bæði vatni og fiski séu fullnægjandi að því er varðar viðkomandi aðferð. Einnig skal ganga úr skugga um að prófunarefnið greinist ekki í þynningarvatninu sem er notað.

Ef nauðsyn krefur skal leiðrétta gildi C_w og C_f fyrir endurheimt og bakgrunnsgildi samanburðarins. Fisk- og vatnssýni skulu ávallt meðhöndluð þannig að mengun og tap séu í lágmarki (t.d. vegna ásogs sýnatökubúnaðarins).

1.8.4.4. Greining fisksýna

Ef geislamerkt efni eru notuð í prófuninni getur greiningin miðast við allt geislamerkta efnið (þ.e. upprunaefnið og umbrotsefni þess) en einnig má hreinsa sýnin þannig að upprunaefnasambandið verði greint sérstaklega. Einnig má lýsa eiginleikum helstu umbrotsefna við stöðugt ástand eða við lok upptökufasans. Ef lífþéttnistuðullinn, mældur sem geislamerktar heildarleifar, er ≥ 1000% getur verið ráðlegt og fyrir efni í tilteknum flokkum, t.d. varnarefni, er eindregið mælt með því að sanngreina þau niðurbrotsefni og magngreina sem eru ≥ 10% af heildarleifum í fiskvefjum við stöðugt ástand. Ef þau niðurbrotsefni sem eru ≥ 10% af geislamerktum heildarleifum í fiskvef eru sanngreind og magn þeirra ákvarðað er einnig mælt með því að slíkt hið sama sé gert að því er varðar niðurbrotsefni í prófunarvatninu.

Styrkur prófunarefnisins skal að jafnaði ákvarðaður fyrir hvern einstakan vigtaðan fisk. Ef það er ekki gerlegt er heimilt að hópa öll sýni við hverja sýnatöku en hópun takmarkar möguleika á tölfræðilegri úrvinnslu gagnanna. Ef tiltekin, tölfræðileg aðferð og tölfræðileg vissa skipta miklu máli skal prófunin ná til nægilega margra fiska til að hún samrýmist þeirri hópun, aðferð og tölfræðilegu vissu sem sóst er eftir.

Lífþéttnistuðullinn skal gefinn bæði sem fall af heildarblautvigt og sem fall af fituefnainnihaldi ef um er að ræða mjög fitusækin efni. Fituefnainnihald fisks er ákvarðað í hverri sýnatöku ef unnt er að koma því við. Nota skal viðeigandi aðferðir til að ákvarða fituefnainnihald (8. og 2. heimild í 3. viðbæti). Mæla má með því að útdráttur með klóróformi/metanóli sé staðalaðferð (9. heimild). Mismunandi aðferðir gefa ekki sömu gildi (10. heimild) og því er mikilvægt að lýsa nákvæmlega þeirri aðferð sem er notuð. Ef unnt er skal gera fituefnagreiningu á sama útdrætti og þeim sem er notaður í greiningunni á prófunarefninu því það þarf oft að fjarlægja fituefnin úr útdrættinum áður en hægt er að greina hann með litskiljun. Munurinn á fituefnainnihaldi fisksins (mælt sem mg/kg blautvigtar) í lok tilraunarinnar og í upphafi hennar má ekki vera meiri en ± 25%. Einnig skal gefa upp hundraðshlutfall fasts efnis í vefjunum til að hægt sé að umreikna fituefnastyrkinn frá blautu ástandi yfir í þurrt.

2. GÖGN

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Upptökuferill prófunarefnisins fæst með því að teikna styrk þess í/á fiski (eða tilgreindum vef) í upptökufasanum sem fall af tíma á línulegum kvarða. Ef ferillinn hefur náð jafnvægi, þ.e. orðinn nokkurn veginn aðfelldur tímaásnum, er lífþéttnistuðullinn (BCF_{ss}) fyrir stöðugt ástand reiknaður út frá:

$$\frac{C_f \text{ sem stöðugt ástand (meðaltal)}}{C_w \text{ sem stöðugt ástand (meðaltal)}}$$

Ef stöðugt ástand næst ekki er mögulegt að reikna BCF_{SS} með nægilegri nákvæmni til nota við hættumat út frá „stöðugu ástandi“ við 80% ($1{,}6/k_2$) eða 95% ($3{,}0/k_2$) af jafnvægi.

Lífþéttnistuðullinn (BCF_k) er einnig ákvarðaður sem hlutfallið k_1/k_2, milli fastanna tveggja við hraðafræði af fyrstu gráðu. Hreinsunarhraðafastinn (k_2) er að jafnaði ákvarðaður út frá hreinsunarkúrfunni (þ.e. ferill styrkminnkunar prófunarefnisins í fiskinum á móti tíma). Fastinn fyrir upptökuhraðann (k_1) er síðan reiknaður að gefnum fastanum k_2 og gildinu fyrir C_f sem er leitt út frá upptökuferlinum (sjá einnig 5. viðbæti). Besta leiðin til að reikna BCF_k og hraðafastana, k_1 og k_2, er að nota ólínulegar aðferðir til að meta þessa þætti í tölvu. (11. heimild). Að öðrum kosti má nota myndrænar aðferðir til að reikna út k_1 og k_2. Ef augljóst er að hreinsunarkúrfan er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (sjá heimildir í 3. viðbæti) og leita ráða hjá líftölfræðingi.

2.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældur styrkur prófunarlausna er nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar.

Vel skilgreindir ferlar fyrir upptöku og útskilnað eru vísbending um að gögnin fyrir lífþéttnina séu traust. Breytileiki í upptöku-/hreinsunarföstunum við hina tvo mismunandi styrkleika prófunarefnisins skal vera minni en 20%. Ef fram kemur marktækur munur á upptöku-/hreinsunarhraða við þá tvo styrkleika sem eru notaðir í prófuninni skal skrá hann og reyna að skýra hann. Almennt séð eru öryggismörk lífþéttnistuðulsins í vel hönnuðum rannsóknum í kringum ± 20%.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

3.1. PRÓFUNAREFNI:

— eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— gögn um efnafræðilega sanngreiningu (þ.m.t. innihald lífræns kolefnis ef við á),

— ef efnið er geislamerkt, nákvæmt staðsetning geislamerktu frumeindarinnar, eða frumeindanna, og hlutfall geislavirkni sem tengist óhreinindum.

3.2. PRÓFUNARTEGUNDIR

— vísindaheiti, stofn, uppruni, hvers kyns formeðhöndlun, aðlögun, aldur, stærðarflokkur o.s.frv.

3.3. PRÓFUNARSKILYRÐI

— prófunaraðferðin sem er notuð (t.d. gegnumstreymis- eða hálfkyrrstöðuprófun),

— tegund og einkenni þeirrar lýsingar sem er notuð og ljóslota eða ljóslotur,

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi og stærð prófunarhólfa, hve hratt er skipt um vatn, fjöldi kerja fyrir samhliða prófanir, fjöldi fiska á hvert ker samhliða prófana, fjöldi prófunarstyrkleika, lengd upptöku- og hreinsunarfasanna og tíðni sýnatöku fyrir fisk og vatn),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og tíðni endurnýjunar (ef uppleysandi efni er notað skal tilgreina styrk þess og hlutdeild þess í innihaldi lífræns kolefnis í prófunarvatninu),

— nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarkerjunum og sú aðferð sem er notuð til að reikna þessi gildi,

— uppruni þynningarvatns, lýsing á hvers kyns formeðhöndlun, niðurstöður úr tilraunum sem eru gerðar til að sýna fram á hæfni prófunarfisksins til að lifa í vatninu og eiginleikar vatnsins: sýrustig, harka, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir, selta í prófunarmiðlinum (ef við á) og allar aðrar mælingar sem gerðar eru,

— vatnsgæði í prófunarkerjum, sýrustig, harka, heildarmagn lífræns kolefnis (TOC), hitastig og styrkur uppleysts súrefnis,

— nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund fóðurs, uppruni, samsetning — a.m.k. að því er varðar fituefna- og prótíninnihald ef unnt er, hve mikið er gefið og hve oft),

— upplýsingar um meðhöndlun fisk- og vatnssýna, þ.m.t. nákvæmar upplýsingar um tilreiðslu, geymslu, útdráttar- og greiningaraðferðir (og samkvæmni) varðandi prófunarefnið og fituefnainnihaldið (ef það er mælt).

3.4. NIÐURSTÖÐUR:

— niðurstöður úr hvers kyns forrannsóknum sem eru gerðar,

— dánartíðni samanburðarfisks og fisks í hverju váhrifahólfi, svo og hvers kyns óeðlilegt atferli,

— fituefnainnihald fisksins (ef það er ákvarðað í tengslum við prófunina),

— ferlar (þ.m.t. öll mæld gögn) sem sýna upptöku og hreinsun prófunaríðefnis í fiskinum og tími þar til stöðugt ástand kemst á,

— C_f og C_w (með staðalfráviki og styrkbili, ef við á), fyrir alla sýnatökutíma (C_f gefið upp í µg/g blautvigtar (milljónarhlutum) alls skrokksins eða tiltekinna vefja hans, t.d. fituvef, og C_wí µg/ml (milljónarhlutum). C_w-gildi fyrir samanburðarröðina (bakgrunnsgildi skulu einnig tilgreind),

— lífþéttnistuðullinn við stöðugt ástand (BCF_{SS}) og/eða hraðafræðilegur þéttnistuðull (BCF_k) og, ef við á, 95% öryggismörk fastanna fyrir upptöku- og hreinsunarhraða (tap) (allt gefið upp í hlutfalli við allan skrokkinn og heildarfituefnainnihald fisksins, ef það er mælt, eða tiltekinna vefja úr honum), öryggismörk og staðalfrávik (liggi þau fyrir) og aðferðir við útreikninga/gagnagreiningu fyrir alla styrkleika prófunarefnisins,

— ef geislamerkt efni eru notuð er hægt að tilgreina uppsöfnun allra umbrotsefna sem greinast ef þess er þörf,

— hvaðeina sem telst óvenjulegt í prófuninni, öll frávik frá þessum aðferðum og allar aðrar upplýsingar sem skipta máli.

Halda skal í lágmarki niðurstöðum á borð við „kemur ekki fram við greiningarmörk“ með þróun á aðferðum í undanfara prófananna og tilraunahönnun þar eð ekki er unnt að nota slíkar niðurstöður við útreikninga á hraðaföstum.

4. **HEIMILDIR**

1) Connell D.W. (1988) Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, bls. 117-156.

2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993) Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, bls. 29-390.

3) OECD, Paris (1996) Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

7) US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

8) Compaan H. (1980) in "The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation" Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

9) Gardner et al, (1995) Limn. & Oceanogr. 30, bls. 1099-1105.

10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, bls. 1431-1436.

11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

1. viðbætir

Efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns

	Efni	Styrkmörk
1	Efnisagnir	5 mg/l
2	Heildarmagn lífræns kolefnis	2 mg/l
3	Ójónað ammoníak	1 µg/l
4	Klórleifar	10 µg/l
5	Heildarmagn fosfórlífrænna varnarefna	50 ng/l
6	Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	50 ng/l
7	Heildarstyrkur lífræns klórs	25 ng/l
8	Ál	1µg/l
9	Arsen	1µg/l
10	Króm	1µg/l
11	Kóbalt	1µg/l
12	Kopar	1µg/l
13	Járn	1µg/l
14	Blý	1µg/l
15	Nikkel	1µg/l
16	Sink	1µg/l
17	Kadmíum	100 ng/l
18	Kvikasilfur	100 ng/l
19	Silfur	100 ng/l

2. viðbætir

Ráðlagðar prófunarfisktegundir

	Ráðlagðar tegundir	Ráðlagt svið prófunarhitastigs (°C)	Ráðlögð heildarlengd prófunardýrs (cm)
1	*Danio rerio* ([1]) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Sebradanni	20–25	3,0 ± 0,5
2	*Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Breiðkollur	20–25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus carpio* (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Vatnakarpi	20–25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck og Schlegel) Rískarpi	20–25	4,0 ± 1,0
5	*Poecilia reticulata* (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Gúbbi	20–25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Röðulborri	20–25	5,0 ± 2,0
7	*Oncorhynchus mykiss* (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regnbogasilungur	13–17	8,0 ± 4,0
8	*Gasterosteus aculeatus* (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Hornsíli	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, bls. 231.

Ýmsar tegundir árósa- og sjávarfiska hafa verið notaðar í hinum ýmsu löndum, t.d.:

Blettabaulari	*Leiostomus xanthurus*
Kjammkerplingur	*Cyprinodon variegatus*
Gljáæringi	*Menidia beryllina*
Skinkarpi	*Cymatogaster aggregata*
Sólflúra	*Parophrys vetulus*
Kvíslbroddi	*Leptocottus armatus*
Hornsíli	*Gasterosteus aculeatus*
Vartari, barri	*Dicentracus labrax*
Hreisturglæsir	*Alburnus alburnus*

Sýnataka

Ferskvatnsfiskarnir, sem eru taldir upp í töflunni, eru auðveldir í eldi og/eða fáanlegir víða allt árið um kring en sjávar- og árósategundirnar fást að hluta eingöngu í tilteknum löndum. Unnt er að fjölga þeim og rækta, annaðhvort í fiskeldisstöðvum eða á rannsóknarstofunni, við stýrð skilyrði að því er varðar sjúkdóma og sníkjudýr svo að prófunarfiskurinn verður heilbrigður og uppruni hans þekktur. Þessir fiskar fást víða um heim.

3. viðbætir

Spáð fyrir um lengd upptöku- og hreinsunarfasanna

1. *Spáð fyrir um lengd upptökufasans*

Áður en prófunin er framkvæmd er unnt að áætla, út frá reynslutengslum milli k_2 og deilistuðli oktanóls/vatns (P_{ow}) eða milli k_2 og leysninnar í vatni, gildi k_2 og því einnig hundraðshluta þess tíma sem það tekur að ná stöðugu ástandi.

Áætla má k_2 (dagur^{-1}), t.d. út frá eftirfarandi reynslutengslum (1. heimild):

$\log_{10}k_2 = 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47$ ($r^2 = 0{,}95$) [1. jafna]

Sjá 2. heimild fyrir önnur tengsl.

Ef deilistuðullinn (P_{ow}) er óþekktur má byggja matið (3. heimild) á upplýsingum um vatnsleysni efnisins (s) með eftirfarandi formúlu:

$\log10(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710$ ($r^2 = 0{,}994$) [2. jafna]

þar sem

s = leysni (mól/l) : (n=36)

Þessi tengsl gilda eingöngu um efni með log P_{ow}-gildi milli 2 og 6,5 (4. heimild).

Reikna má, með því að nota metna gildið fyrir k_2, þann tíma sem líður þar til fengist hefur tiltekinn hundraðshluti af stöðugu ástandi út frá almennu hraðajöfnunni sem lýsir upptöku og hreinsun (hraðafræði af fyrstu gráðu):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

eða ef C_w er stöðugt:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \left(1 - e^{-k_2 t}\right)$$ [3. jafna]

Þegar stöðugt ástand nálgast ($t \rightarrow \infty$), má stytta 3. jöfnu (5. og 6. heimild) í:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ or } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Þá er $k_1/k_2 \cdot C_w$ nálgun að styrknum í fiskinum við „stöðugt ástand“ ($C_{f,s}$).

Umrita má 3. jöfnu þannig að hún verði:

$$C_f = C_{f,s}\left(1 - e^{-k_2 t}\right) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t}$$ [4. jafna]

Með því að nota 4. jöfnu má áætla tímann sem líður þar til tilteknum hundraðshluta af stöðugu ástandi er náð ef gildið fyrir k_2 hefur verið áætlað fyrir fram út frá 1. eða 2. jöfnu.

Hafa má til hliðsjónar að tölfræðileg kjörlengd upptökufasans til þess að fá tölfræðilega, viðunandi gögn (BCF_k) er sá tími sem líður þar til ferillinn fyrir logrann af styrk prófunarefnisins í fiskinum á móti tímanum (á línulegum ási) hefur náð miðpunkti, eða $1{,}6/k_2$, eða 80% af stöðugu ástandi en er ekki yfir $3{,}0/k_2$ eða 95% af stöðugu ástandi (7. heimild).

Tíminn, sem líður þar til 80% af stöðugu ástandi er náð, er (4. jafna):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1{,}6}{k_2}$$ [5. jafna]

Samsvarandi eru 95% af stöðugu ástandi:

$$t_{95} = \frac{3{,}0}{k_2}$$ [6. jafna]

Lengd upptökufasans (up) fyrir prófunarefni með log P_{ow} = 4 yrði t.d. (með því að nota 1., 5. og 6. jöfnu):

$\log_{10} k_2 = -0{,}414.(4) + 1{,}47$ $k_2 = 0{,}652$ dagur^{-1}

up (80%) = 1,6/0,652, þ.e. 2,45 dagar (59 klukkustundir)

eða up (95%) = 3,0/0,652, þ.e. 4,60 dagar (110 klukkustundir)

Samsvarandi, fyrir prófunarefni með s = 10^{-5} mól/l (log(s) = -5,0), yrði lengd up (með því að nota 1., 2. og 6. jöfnu):

log10 (P_{ow}) = 0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02

$\log_{10} k_2$ = 0,414 (5,02) + 1,47

k_2 = 0,246 dagur^{-1}

up (80%) = 1,6/0,246, þ.e. 6,5 dagar (156 klukkustundir)

eða up (95%) = 3,0/0,246, þ.e. 12,2 dagar (293 klukkustundir)

Að öðrum kosti má nota jöfnuna:

t_{eq} = 6,54 × 103 P_{ow} + 55,31 (klukkustundir)

til að reikna þann tíma sem líður þar til virkt, stöðugt ástand er komið á (4. heimild).

2. *Spáð fyrir um lengd hreinsunarfasans*

Út frá almennu jöfnunni sem lýsir upptöku og hreinsun (hraðafræði af fyrstu gráðu) (1. og 8. heimild) má einnig spá fyrir um þann tíma sem þarf til að minnka líkamsálag niður í tiltekinn hundraðshluta af upphaflega styrknum.

Í hreinsunarfasanum telst C_w vera núll. Jöfnuna má einfalda þannig að hún verði:

$$\frac{dC_f}{dt} = K_2 C_f \text{ eða } C_f = C_{f_o} \cdot e^{-k2t}$$

þar sem $C_{f,o}$ er styrkurinn í upphafi hreinsunarímabilsins. Á tímapunktinum t_{50} hefur þá náðst 50% hreinsun:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{eða} \quad t_{50} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Samsvarandi næst 95% hreinsun við:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ef miðað er við 80% upptöku á fyrsta tímabilinu ($1,6/k_2$) og 95% tap í hreinsunarfasanum ($3,0/k_2$) verður hreinsunarfasinn u.þ.b. tvöfalt lengri en upptökufasinn.

Mikilvægt er þó að hafa í huga að matið byggist á þeirri forsendu að upptaka og hreinsun fylgi hraðafræði af fyrstu gráðu. Ef augljóst er að hraðafræðin er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (t.d. 1. heimild).

Heimildir (3. viðbætis)

1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, bls 309-320.

2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), bls 4-10.

4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), bls 701-707.

5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), bls 785-792.

6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, bls 614-622.

8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, bls 3-19.

4. viðbætir

Fræðilegt dæmi um sýnatökuáætlun fyrir lífþéttniprófanir á efnum með log P_{ow} = 4

Taka sýna af fiskum	Tímaáætlun sýnatöku		Fjöldi vatnssýna	Fjöldi fiska í hverju sýni
	Nauðsynleg lágmarkstíðni (dagar)	Viðbótarsýnataka		
Upptökufasi	-1 0		2 (*) 2	bætt við 45–80 fiskum
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Hreinsunarfasi				Fiskur fluttur í vatn sem er laust við prófunaríðefni
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Tölur í svigunum eru fjöldi sýna (af vatni eða fiski) sem taka skal ef viðbótarsýni eru tekin.

Athugasemd: fyrir prófunina er k_2 fyrir log P_{ow} 4,0 áætlað 0,652 $dagur^{-1}$. Heildarlengd tilraunarinnar er sett á 3 x up = 3 x 4,6 dagar, þ.e. 14 dagar. Upplýsingar um matið á „up“ er að finna í 3 viðbæti.

5. viðbætir

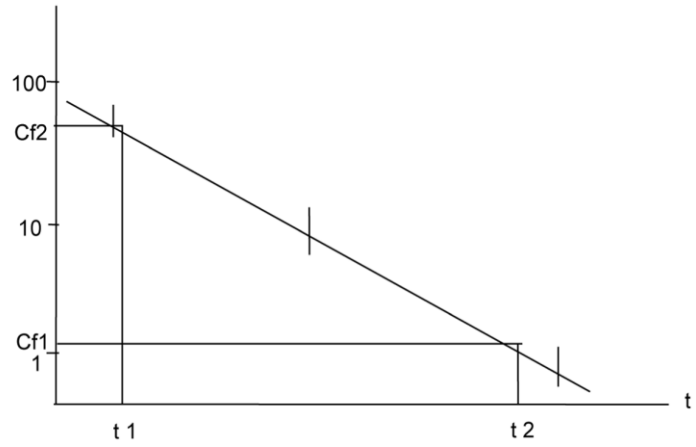
Lýsing á líkani

Flestum lífþéttnigögnum hefur mátt lýsa „tiltölulega“ vel með einföldu tveggja hólfa/tveggja mæliþátta líkani, eins og sést af besta beina ferlinum fyrir styrkleikapunktana í fiskinum í hreinsunarfasanum þegar ferillinn er dreginn á hálflograpappír. (Ef ekki er hægt að lýsa þessum punktum með beinum ferli skal nota flóknari líkön, sjá t.d. Spacie og Hamelink, 1. heimild í 3. viðbæti).

Myndræn aðferð til að ákvarða hreinsunar(tap)hraðafastann k_2

Styrkleiki prófunarefnisins úr hverju fisksýni er teiknaður upp á móti sýnatökutímanum á hálflograpappir. Halli þeirrar línu er k_2.

$$k_2 = \frac{\ln\left(C_{f1}/C_{f2}\right)}{t_2 - t_1}$$



Athygli er vakin á því að frávik frá beinni línu getur verið vísbending um að hreinsunin sé flóknari en svo að hraðafræði hennar sé af fyrstu gráðu. Nota má myndræna aðferð til að greina þær tegundir hreinsunar sem víkja frá fyrstu gráðu hraðafræði.

Myndræn aðferð til að ákvarða hraðafastann k_1 fyrir upptöku

Að gefnu gildinu fyrir k_2 skal reikna k_1 á eftirfarandi hátt:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right)} \qquad \text{(1. jafna)}$$

Gildi C_f er lesið af við miðpunktinn á slétta upptökuferlinum sem fæst út frá gögnunum þegar logrinn af styrknum er teiknaður á móti tíma (á línulegum kvarða).

Aðferð til að reikna hraðafastana fyrir upptöku og hreinsun (tap) í tölvu

Besta leiðin til að reikna lífþéttnistuðulinn og hraðafastana k_1 og k_2 er að nota ólínulegar aðferðir til að meta þessa þætti í tölvu. Slík forrit reikna gildin á k_1 og k_2 út frá safni gagna um styrk í tímaröð og eftirfarandi:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(2. jafna)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c$$

(3. jafna)

þar sem t_c = tíminn í lok upptökufasans.

Með þessari nálgun má áætla staðalfrávikið fyrir k_1 og k_2.

Sökum þess að í flestum tilvikum er unnt að áætla k_2 með talsverðri nákvæmni út frá hreinsunarkúrfunni og vegna þess að sterk fylgni er milli þáttanna tveggja, k_1 og k_2, ef þeir eru áætlaðir samtímis getur verið skynsamlegt að reikna fyrst k_2 út frá hreinsunargögnunum einum og reikna síðan k_1 út frá upptökugögnunum með ólínulegri aðhvarfsgreiningu.

C.14. VAXTARPRÓFUN Á UNGFISKI

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á eiturhrifum á vöxt er eins og í OECD-viðmiðunarreglu 215 um prófanir (2000).

1.1. INNGANGUR

Tilgangurinn með þessari prófun er að meta áhrif af langvarandi váhrifum íðefna á vöxt ungfisks. Hún byggist á aðferð sem hefur verið þróuð og hringprófuð (1. og 2. heimild) innan Evrópusambandsins í því skyni að meta áhrif íðefna á vöxt ungfiska af tegund regnbogasilungs (*Oncorynchus mykiss*) við gegnumstreymisaðstæður. Heimilt er að nota aðrar tegundir sem hafa mikið verið rannsakaðar. Reynsla hefur t.d. þegar fengist við vaxtarprófanir á sebradanna (*Danio rerio*) ([1]) 3. og 4. heimild) og rískarpa (*Oryzias latipes*) (5., 6. og 7. heimild).

Sjá einnig almennan inngang að C-hluta.

1.2. SKILGREININGAR

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti styrkur prófunarefnis þar sem efnið reynist hafa marktæk áhrif (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhóp. Í öllum prófunum, þar sem styrkur er meiri en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, skal hann á hinn bóginn valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum, merkjanlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif.

EC_x: sá styrkur prófunarefnisins sem veldur x% fráviki í vaxtarhraða fisksins í þessari prófunaraðferð miðað við samanburðarhópana.

Hleðsluhlutfall: blautvigt fiska miðað við rúmmál vatns.

Þéttleiki fiska: fjöldi fiska miðað við rúmmál vatns.

Sértækur vaxtarhraði eins fisks: vaxtarhraði eins fisks, reiknaður út frá upphafsþyngd hans.

Sértækur meðalvaxtarhraði í keri: meðalvaxtarhraði þýðis í keri við einn tiltekinn styrk.

Sýndarsértækur vaxtarhraði: vaxtarhraði einstaklinga miðað við meðalupphafsþyngd þýðisins í kerinu.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ungfiskur, sem er í veldisvaxtarfasa, er veginn og síðan settur í prófunarker og látinn verða fyrir váhrifum frá prófunarefni, sem er uppleyst í vatni í mismunandi styrkleikum sem eru nær banvænir, og helst skal hann vera við gegnumstreymisskilyrði eða, ef því verður ekki við komið, við viðeigandi hálfkyrrstöðu-skilyrði (slitrótta endurnýjun). Prófunin skal standa í 28 daga. Fiskurinn skal fóðraður daglega. Fóðurskammturinn grundvallast á þyngd fisksins í upphafi og hann má endurreikna að liðnum 14 dögum. Fiskurinn er veginn aftur í lok prófunarinnar. Áhrif á vaxtarhraða eru greind með því að nota aðhvarfslíkan til að reikna þann styrk sem orsakar x% frávik í vaxtarhraða, þ.e. EC_x (t.d. EC_{10}, EC_{20} eða EC_{30}). Annar kostur er að bera gögnin saman við samanburðargildi til að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og síðan styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif.

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturhrifum (sjá prófunaraðferð C. 1), sem á helst að hafa verið gerð á þeirri tegund sem valin var fyrir þessa prófun, skulu vera fyrirliggjandi. Það felur í sér að leysni í vatni og gufuþrýstingur prófunarefnisins eru þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð er til, sem nota má við magngreiningu efnisins í prófunarlausnunum, og nákvæmni og greiningarmörk aðferðarinnar eru þekkt og skráð.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236.

Gagnlegar upplýsingar eru m.a. byggingarformúlan, hreinleiki efnisins, stöðugleiki í vatni og ljósi, pKa-gildi, P_{ow}-gildi og niðurstöður úr prófun á auðlífbrjótanleika (sjá prófunaraðferð C.4).

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

— dánartíðni í samanburðarhópnum (-hópunum) má ekki vera meira en 10% við lok prófunar,

— meðalþyngd fiska í samanburðarhópnum (-hópunum) skal hafa aukist nægilega til þess að unnt sé að greina þá lágmarksbreytingu á vaxtarhraða sem telst marktæk. Hringprófun (2. heimild) hefur leitt í ljós að fyrir regnbogasilung verður meðalþyngd fiska í samanburðarhópunum að hafa aukist um a.m.k. helming (þ.e. 50%) af meðalupphafsþyngd þeirra á 28 dögum; t.d. upphafsþyngd: 1 g/fiskur (= 100%), lokaþyngd eftir 28 daga: ≥ 1,5 g/fisk (≥ 150%);

— styrkur uppleysts súrefnis skal í allri prófuninni vera a.m.k. 60% af mettunargildi lofts,

— ekki má muna meira á vatnshitastiginu milli prófunarkera en ± 1 °C á hverjum tíma meðan á prófuninni stendur og skal viðhalda hitanum innan 2 °C frá því hitasviði sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (1. viðbætir).

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Venjulegur rannsóknarstofubúnaður og einkum eftirfarandi:

— súrefnis- og sýrustigsmælar,

— búnaður til að ákvarða hörku vatns og basavirkni,

— fullnægjandi tæki til að stýra hita, helst með stöðugri vöktun,

— ker úr efnafræðilega óvirku efni og hæfilega stór miðað við ráðlagt hleðsluhlutfall og þéttleika fiska (sjá lið 1.8.5 og 1. viðbæti),

— nægilega nákvæm vog (þ.e. nákvæmni upp á ± 0,5%).

1.6.2. **Vatn**

Nota má hvers kyns vatn sem prófunarvatn svo fremi að prófunartegundin sýni þar nægilega lifun og vöxt til langs tíma. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. pH-gildið skal vera á bilinu 6,5– 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en ± 0,5 pH-stig. Mælt er með því að harka sé yfir 140 mg/l (mælt sem $CaCO_3$). Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunarefninu) skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar skulu gerðar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4), varnarefnum (t.d. heildarmagni fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna, t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að vatnsgæði hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálli (t.d. á sex mánaða fresti). Nokkrir efnaeiginleikar viðunandi þynningarvatns eru tilgreindir í 2. viðbæti.

1.6.3. **Prófunarlausnir**

Prófunarlausnir af þeim styrkleikum, sem valdir eru hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn.

Einfaldast er að tilreiða stofnlausnina með því að blanda eða hrista prófunarefnið saman við þynningar-vatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur (leysnisúlur) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk.

Í tilteknum tilvikum kann þó að vera nauðsynlegt að nota leysa eða dreifiefni (uppleysandi efni) til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Heppilegir leysar eru t.d. aseton, etanól, metanól, dímetýlsúlfoxíð, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól. Heppileg dreifiefni eru m.a. Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% metýlsellulósi og HCO-40. Gæta skal varúðar ef notuð eru auðlífbrjótanleg efni (t.d. aseton) og/eða mjög rokgjörn efni þar eð þau geta skapað vanda vegna þess að bakteríur geta safnast fyrir í gegnumstreymisprófunum. Ef uppleysandi efni er notað má það hvorki hafa marktæk áhrif á vöxt fisksins né merkjanleg, skaðleg áhrif á ungfiskinn en það skal kannað með samanburðarprófun þar sem eingöngu er notaður leysir.

Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunarefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað eða mettunarkerfi) og flytur raðir styrkleika í prófunarkerin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega, helst daglega, meðan prófunin stendur og í allri prófuninni skal frávik í streyminu ekki vera meira en 10%. Hringprófun (2. heimild) hefur leitt í ljós að þegar um regnbogasilung er að ræða er viðunandi endurnýjun vatns í prófuninni 6 lítrar/g af fiski á dag (sjá lið 1.8.2.2).

Í hálfkyrrstöðuprófunum (prófunum með endurnýjun) skal endurnýjunartíðni miðilsins ráðast af stöðugleika prófunarefnisins en mælt er með því að allt vatnið sé endurnýjað daglega. Ef áður gerðar forprófanir á stöðugleika (sjá lið 1.4) hafa leitt í ljós að styrkur prófunarefnisins er ekki stöðugur á endurnýjunartímabilinu (þ.e. utan bilsins 80–120% af nafnstyrk eða hann fellur niður fyrir 80% af mældum upphafsstyrk) skal vega það og meta hvort nota skuli gegnumstreymisprófun.

1.6.4. **Val á dýrategund**

Mælt er með því að nota regnbogasilung (*Oncorhynchus mykiss*) í þessari prófun þar eð mest reynsla hefur fengist í hringprófunum með þeirri tegund (1. og 2. heimild). Nota má aðrar tegundir sem hafa verið rannsakaðar mikið en vera má að breyta þurfi tilhögun prófunarinnar svo að prófunarskilyrði verði við hæfi. Til dæmis hefur einnig fengist reynsla af sebradanna (*Danio rerio*) (3. og 4. heimild) og rískarpa (medaka, *Oryzias latipes*) (5., 6. og 7. heimild). Færa skal rök fyrir vali tegundarinnar og tilraunaaðferðarinnar í slíkum tilvikum.

1.6.5. **Eldi fisksins**

Prófunarfiskurinn skal valinn úr þýði eins stofns, helst úr sömu hrygningu, sem hefur verið alið í a.m.k. tvær vikur fyrir prófunina við skilyrði þar sem gæði vatns og lýsing eru svipuð því sem verður í prófuninni. Fiskurinn skal fóðraður með skammti sem nemur a.m.k. 2% af líkamsþyngd á dag og helst 4% líkamsþyngdar á dag á eldistímanum og í prófuninni.

Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili er dánartíðni skráð og stuðst við eftirfarandi viðmiðanir:

— dánartíðni meiri en 10% af þýðinu á sjö dögum: hafna skal allri lotunni,

— dánartíðni milli 5% og 10% af þýðinu: aðlögun í sjö daga til viðbótar; ef dánartíðnin er meiri en 5% á næsta sjö daga tímabili: hafna skal allri lotunni;

— dánartíðni undir 5% af þýðinu á sjö dögum: lotan er ásættanleg.

Fiskur má ekki hafa hlotið meðhöndlun gegn sjúkdómi í tvær vikur fyrir prófunina og ekki heldur fá slíka meðhöndlun meðan prófun varir.

1.7. TILHÖGUN PRÓFUNAR

„Tilhögun prófunar“ vísar til ákvörðunar um fjölda prófunarstyrkleika og styrkbilin, fjölda kera við hvern styrk og fjölda fiska í hverju keri. Þegar tilhögun prófunarinnar er ákveðin skal helst taka tillit til eftirfarandi:

— markmiðs rannsóknarinnar,

— þeirrar aðferðar sem verður notuð við tölfræðilega greiningu,

— tiltækileika aðfanga til tilraunarinnar og kostnaðar við þau.

Í lýsingu á markmiðinu skal, ef unnt er, tilgreina þann tölfræðilega styrk sem þarf til að greina tiltekinn stærðarmun (t.d. varðandi vaxtarhraða) eða, að öðrum kosti, þá nákvæmni sem þarf til að meta EC_x (t.d. þar sem x = 10, 20 eða 30 og helst ekki minna en 10). Þetta er forsenda þess að unnt sé að ákveða umfang rannsóknarinnar með öryggi.

Mikilvægt er að gera sér grein fyrir því að sú tilhögun sem hentar best (nýtir best öll aðföng) við tiltekna aðferð við tölfræðilega greiningu þarf ekki að vera sú heppilegasta þar sem önnur aðferð er notuð. Sú tilhögun, sem mælt er með við mat á minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, eða styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif, yrði því ekki sú sem mælt yrði með ef nota ætti aðhvarfsgreiningu.

Af ástæðum, sem Stephan og Rogers fjalla um (8. heimild), er aðhvarfsgreining í flestum tilvikum heppilegri en dreifnigreining. Finnist á hinn bóginn ekkert heppilegt aðhvarfslíkan ($r_2 < 0,9$) skal nota styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC), eða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC).

1.7.1. **Tilhögun að því er varðar aðhvarfsgreiningu**

Mikilvægustu atriðin, sem taka þarf tillit til í tengslum við tilhögun prófunar þar sem beita skal aðhvarfsgreiningu, eru:

— Þeir styrkleikar, sem eru notaðir í prófuninni, skulu ná yfir hrifstyrkina (t.d. $EC_{10, 20, 30}$) og styrksviðið sem verið er að kanna m.t.t. áhrifa prófunarefnisins. Samkvæmnin, sem hægt er að meta hrifstyrkina með, verður mest þegar hrifstyrkurinn er á miðju styrksviðinu sem er notað í prófuninni. Gagnlegt getur verið að nota forprófun til að velja viðeigandi styrkleika í prófuninni.

— Til að unnt sé að setja upp fullnægjandi tölfræðilíkan skal í prófuninni vera a.m.k. eitt samanburðarker og fimm viðbótarker við mismunandi styrkleika. Ef við á, þegar uppleysandi efni er notað, skal prófa einn samanburðarhóp með uppleysandi efninu við hæsta styrkinn, sem er notaður í prófuninni, til viðbótar við prófunarröðina (sjá liði 1.8.3 og 1.8.4).

— Nota má viðeigandi jafnhlutfallaröð eða lograröð (9. heimild) (sjá 3. viðbæti). Bil milli mismunandi styrkleika í prófuninni skulu helst vera í lografasa.

— Ef fleiri en sex ker eru til ráðstöfunar skal annaðhvort nota viðbótarkerin til að gera samhliða prófun eða dreifa þeim jafnt yfir styrksviðið til að minnka bilin á milli styrkleikanna í prófuninni. Báðir kostirnir eru ámóta fýsilegir.

1.7.2. **Tilhögun við mat á styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif, eða minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, með dreifnigreiningu (ANOVA)**

Helst skulu vera ker til samhliða prófana fyrir hvern styrkleika og tölfræðileg greining skal gerð fyrir einstök ker (10. heimild). Ef engin ker eru til samhliða prófana má ekkert frávik vera í breytileika milli kera umfram það sem rekja má til einstakra fiska. Reynslan hefur þó leitt í ljós (11. heimild) að breytileiki milli kera var mjög lítill miðað við þann breytileika sem var í hverju keri (þ.e. milli einstakra fiska) í því tilviki sem var skoðað. Af þeim sökum er það tiltölulega viðunandi kostur að gera tölfræðilega greiningu út frá einstökum fiskum.

Að jafnaði eru notaðir a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar sem eru í jafnhlutfallaröð með stuðli sem má helst ekki fara yfir 3,2.

Almennt gildir að ef gerðar prófanir með kerum fyrir samhliða prófanir skal fjöldi samanburðarkera til samhliða prófana, og þar með fjöldi fiska, yfirleitt vera tvöfaldur sá fjöldi sem er notaður fyrir hvern prófunarstyrkleika en sá fjöldi skal vera sá sami (12., 13. og 14. heimild). Fjöldi fiska í samanburðar-hópnum skal hins vegar vera sá sami og fjöldinn við hvern prófunarstyrkleika ef engin ker eru fyrir samhliða prófanir.

Ef gengið er út frá kerum við dreifnigreininguna en ekki einstökum fiskum (sem felur þá annaðhvort í sér að hver einstakur fiskur verði merktur eða stuðst verði við svokallaðan „sýndarsértækan“ vaxtarhraða (sjá lið 2.1.2)) er nauðsynlegt að hafa nógu mörg ker fyrir samhliða prófanir til að unnt sé að ákvarða staðalfrávik styrkleika í kerum með sama styrkleika. Þetta merkir að frítala fyrir skekkju í dreifnigreiningu skal a.m.k. vera 5 (10. heimild).

Ef aðeins eru gerðar samhliða prófanir fyrir samanburðarprófanir er hætt við bjaga í skekkjufráviki þar eð það getur aukist með vaxandi meðalgildi fyrir viðkomandi vaxtarhraða. Þar eð líklegt er að vaxtarhraði minnki með auknum styrk kemur fram tilhneiging til þess að ofmeta breytileikann.

1.8. VERKFERLI

1.8.1. **Val á prófunarfiski og vigtun hans**

Brýnt er að breytileiki í þyngd fiskanna í upphafi prófunarinnar sé sem minnstur. Heppilegt stærðarbil fyrir þær mismunandi tegundir, sem mælt er með fyrir þessa prófun, er tilgreint í 1. viðbæti. Þyngd einstakra fiska í allri fiskalotunni, sem er notuð í prófuninni, má í upphafi prófunar helst ekki víkja meira en ± 10% frá meðalþyngdinni og má ekki í neinum tilvikum víkja meira en 25% frá henni. Mælt er með því að undirúrtak fiska sé vegið, áður en prófunin er gerð, til þess að áætla meðalþyngdina.

Stofnfiskurinn skal ekki fóðraður í 24 klukkustundir áður en prófunin hefst. Fiskar skulu svo valdir af handahófi. Nota skal svæfingarlyf (t.d. vatnslausn með tríkaínmetansúlfónati (MS 222) í styrknum 100 mg/l, hlutleyst með því að bæta við tveimur hlutum af natríumbíkarbónati fyrir hvern hluta af MS 222) og finna blautvigt fiskanna (þerraðir með pappír), hvers og eins, með þeirri nákvæmni sem er tilgreind í 1. viðbæti. Halda skal eftir þeim fiskum sem eru innan tilskilins sviðs að vigt og síðan skal þeim deilt af handahófi á prófunarílátin. Skrá skal heildarblautvigt fiska í hverju prófunaríláti. Notkun svæfingarlyfs sem og meðhöndlun fisksins (þ.m.t. þegar hann er þerraður og veginn) getur vakið streitu hjá ungfiski og skaddað hann, einkum ef um er að ræða smávaxnar fisktegundir. Þess vegna skal meðhöndla ungfisk með ítrustu gætni til að komast hjá því að prófunardýrin fyllist streitu eða skaddist.

Fiskarnir skulu vegnir á ný á 28. degi prófunarinnar (sjá lið 1.8.6). Ef það er talið nauðsynlegt að endurreikna fóðurskammtinn má þó vega fiskana aftur á 14. degi prófunarinnar (sjá lið 1.8.2.3). Nota má aðra aðferð, t.d. aðferð með ljósmyndun, til að ákvarða breytingar á stærð fiska, sem síðan má stilla fóðurskammtinn út frá.

1.8.2. **Váhrifaskilyrði**

1.8.2.1. *Lengd*

Prófunin skal standa í 28 daga.

1.8.2.2. *Hleðsluhlutfall og þéttleiki fiska*

Mikilvægt er að hleðsluhlutfall og þéttleiki fiskanna hæfi þeirri tegund sem er notuð í prófuninni (sjá 1. viðbæti). Ef þéttleiki fiskanna er of mikill kemur fram þrengslastreita sem dregur úr vaxtarhraða og getur leitt til sjúkdóma. Ef þéttleikinn er of lítill er hætt við að óðalsatferli komi fram sem getur einnig haft áhrif á vöxt. Hleðsluhlutfallið skal í öllum tilvikum ekki vera hærra en svo að styrkur uppleysts súrefnis haldist við a.m.k. 60% af mettunargildi lofts án loftunar. Niðurstöður hringprófunar (2. heimild) hafa sýnt að þegar um regnbogasilung er að ræða er hleðsluhlutfallið hæfilegt þegar 16 silungar sem eru 3–5 g eru í 40 lítrum vatns. Æskileg endurnýjun vatns í prófuninni er 6 lítrar/g af fiski á dag.

1.8.2.3. *Fóðrun*

Fiskurinn skal fóðraður með viðeigandi fóðri (1. viðbætir) og gefið nægilega mikið til þess að framkalla viðunandi vaxtarhraða. Þess skal gætt að örverur nái ekki að þrífast og að vatnið verði ekki gruggugt. Þegar um regnbogasilung er að ræða er líklegt að fóðurgjöf, sem nemur um 4% af líkamsþyngd þeirra á dag, nægi til að uppfylla þessi skilyrði (2., 15., 16. og 17. heimild). Daglegum skammti má skipta í tvo jafna hluta og gefa fiskunum í tveimur fóðrunum á dag með minnst 5 klst. millibili. Skammturinn er byggður á samanlagðri upphafsþyngd fiskanna í hverju prófunaríláti fyrir sig. Ef fiskarnir eru vegnir aftur á 14. degi skal endurreikna skammtinn þá. Fiskunum skal ekki gefið neitt fóður í 24 klukkustundir áður en þeir eru vegnir.

Daglega skal fjarlægja óétið fóður og saurkyns efni úr prófunarílátunum og hreinsa botn hvers kers vandlega með sogbúnaði.

1.8.2.4. *Ljós og hiti*

Haga skal ljóslotum og vatnshitastigi þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (1. viðbætir).

1.8.3. **Prófunarstyrkleikar**

Yfirleitt þarf að nota fimm mismunandi styrkleika prófunarefnisins, án tillits til þess hvernig tilhögun prófunarinnar er háttað (sjá lið 1.7.2). Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunarefnisins (t.d. úr rannsóknum á bráðum eiturhrifum og/eða skammtastærðarrannsóknum) ætti að koma að gagni við val á hæfilegum prófunarstyrkleikum. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm mismunandi styrkleikar eru notaðir. Mesti prófunarstyrkur skal ekki vera meiri en sem nemur leysnimörkum efnisins í vatni.

Ef uppleysandi efni er notað sem hjálparefni þegar stofnlausn er tilreidd skal lokastyrkur þess ekki vera meiri en 0,1 ml/l og hann skal helst vera sá sami í öllum prófunarílátum (sjá lið 1.6.3). Í lengstu lög skal þó reynt að komast hjá notkun slíkra efna.

1.8.4. **Samanburður**

Fjöldi samanburðarkera með þynningarvatni ræðst af tilhögun prófunarinnar (sjá liði 1.7–1.7.2). Ef uppleysandi efni er notað skal einnig hafa samanburðarker með uppleysandi efni og fjöldi þeirra skal vera sá sami og er fyrir samanburðarker með þynningarvatni.

1.8.5. **Tíðni magngreininga og mælinga**

Í prófuninni eru styrkleikar prófunarefnisins ákvarðaðir með reglulegu millibili (sjá hér á eftir).

Við gegnumstreymisprófanir skal athuga streymi þynningarlausnarinnar og eiturefnisstofnlausnarinnar reglulega, helst daglega, og frávik í streyminu ætti ekki að vera meira en sem nemur 10% í allri prófuninni. Ef þess er vænst að styrkleikar prófunarefnisins verði innan markanna ± 20% af nafnstyrk (þ.e. á bilinu 80–120%, sjá liði 1.6.2 og 1.6.3) er mælt með því að mesti og minnsti prófunarstyrkur sé a.m.k. ákvarðaður í upphafi prófunar og síðan vikulega. Ef um er að ræða prófun þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk (út frá stöðugleikagögnum um prófunarefnið) er nauðsynlegt að ákvarða alla prófunarstyrkleika en fylgja sama fyrirkomulagi.

Í hálfkyrrstöðuprófunum (prófunum með endurnýjun), þar sem þess er vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% frá nafnstyrk, er mælt með því að mesti og minnsti prófunarstyrkur verði a.m.k. ákvarðaður í nýtilreiddum lausnum og rétt áður en til endurnýjunar kemur í upphafi rannsóknarinnar og síðan vikulega. Ef um er að ræða prófun þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk skal ákvarða alla prófunarstyrkleika og fylgja sama fyrirkomulagi og þegar um stöðugri efni er að ræða.

Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef unnt er að sýna fram á að styrkur prófunarefnisins í lausn hafi haldist á fullnægjandi hátt innan markanna ±20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó grundvallast á nafngildum eða mældum upphafsgildum.

Ef til vill þarf að sía sýni (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 μm) eða setja þau í skilvindu. Æskilegast er að setja sýnin í skilvindu. Ef prófunarefnið ásogast ekki á síur er síun hins vegar viðunandi aðferð.

Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig og hita í öllum prófunarílátum. Mæla skal heildarhörku, basavirkni og seltu (ef við á) í samanburðarkerunum og í einu keri þar sem styrkurinn er mestur. Uppleyst súrefni og selta (ef við á) skulu hið minnsta mæld þrisvar sinnum (í upphafi prófunar, í henni miðri og í lokin). Í hálfkyrrstöðuprófunum er mælt með að uppleyst súrefni sé mælt oftar, helst fyrir og eftir hverja endurnýjun á vatni eða minnst einu sinni í viku. Sýrustig skal mæla við upphaf og lok hverrar vatnsendurnýjunar í kyrrstöðu-endurnýjunarprófun og minnst vikulega í gegnumstreymisprófunum. Harka og basavirkni skulu mæld einu sinni í hverri prófun. Helst ætti að vakta hitastigið stöðugt í a.m.k. einu prófunaríláti.

1.8.6. **Athuganir**

Vigtun: allir lifandi fiskar skulu vegnir sem blautvigt (þ.e. þerraðir með pappír) í lok prófunar, annaðhvort í hópi fyrir hvert prófunarílát eða hver fyrir sig. Æskilegra er að vega fiskana í hópi en hvern fyrir sig því að það krefst þess að hver fiskur verði merktur sérstaklega. Ef hver fiskur er mældur í því skyni að ákvarða sértækan vaxtarhraða hvers fisks skal velja aðferð til merkingar sem veldur sem minnstri streitu (í stað þess að nota frostmerkingu má t.d. nota fíngerða og litaða fiskilínu).

Fiskurinn skal skoðaður daglega á prófunartímabilinu og skrá skal öll afbrigði í ytri gerð (s.s. blæðingu og óeðlilegan lit) og óeðlilegt atferli. Öll dauðsföll skulu skráð og fjarlægja skal dauða fiska eins fljótt og unnt er. Ekki skal setja nýja fiska í stað þeirra sem drepast því að hleðsluhlutfallið og þéttleiki fiskanna nægja til að áhrif á vöxt komi ekki fram þótt breyting verði á fjölda fiska í keri. Á hinn bóginn er nauðsynlegt að endurstilla fóðurmagnið.

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Mælt er með því að tölfræðingur komi bæði að útfærslu og greiningu prófunarinnar þar sem þessi prófunaraðferð gefur kost á talsverðum breytileika í tilhögun tilraunarinnar, eins og t.d. að því er varðar fjölda prófunarkera, fjölda mismunandi prófunarstyrkleika, fjölda fiska o.s.frv. Í ljósi þeirra valkosta, sem eru fyrir hendi við tilhögun prófunar, eru ekki gefnar sérstakar leiðbeiningar um tölfræðilegar aðferðir hér.

Ekki skal reikna vaxtarhraða í prófunarílátum þar sem dánarhlutfall er meira en 10%. Dánarhlutfall skal þó tilgreint fyrir alla prófunarstyrkleika.

Lykilhugtakið er sértæki vaxtarhraðinn r frá tímanum t_1 til tímans t_2, óháð því hvaða aðferð er notuð til þess að greina gögnin. Það má skilgreina á margvíslegan hátt og ræðst af því hvort hver fiskur er merktur út af fyrir sig eða hvort reikna verði meðaltal fyrir hvert ker.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

þar sem:

r_1 = sértækur vaxtarhraði hvers fisks

r_2 = sértækur meðalvaxtarhraði fyrir hvert ker

r_3 = „sýndarsértækur“ vaxtarhraði

w_1, w_2 = þyngd tiltekins fisks á tímunum t_1 og t_2, í sömu röð

$\log_e w_1$ = logri af þyngd tiltekins fisks við upphaf rannsóknartímabilsins

$\log_e w_2$ = logri af þyngd tiltekins fisks í lok rannsóknartímabilsins

$\log_e w_1$ = meðaltal af logrunum fyrir gildi w_1 fyrir fiskana í kerinu í upphafi rannsóknartímabilsins

$\log_e w_2$ = meðaltal af logrunum fyrir gildi w_2 fyrir fiskana í kerinu við lok rannsóknartímabilsins

t_1, t_2 = tími (dagar) við upphaf og í lok rannsóknartímabilsins

Reikna má r_1, r_2, r_3 fyrir 0–28 daga tímabil og, ef við á (þ.e. þegar mælingum á 14. degi er lokið), fyrir 0–14 daga og 14–28 daga tímabil.

2.1.1. Aðhvarfsgreining niðurstaðna (líkan yfir styrk og svörun)

Þessi greiningaraðferð felur í sér viðeigandi stærðfræðivensl milli sértæks vaxtarhraða og styrks og gerir því kleift að meta „EC_x“, þ.e. hvaða EC-gildi sem er. Þegar þessi aðferð er notuð er ekki nauðsynlegt að reikna r fyrir hvern fisk (r_1) heldur má grundvalla greininguna á meðaltalinu r fyrir hvert ker (r_2). Síðari aðferðin er æskilegri. Hún er auk heldur heppilegri þegar notaðar eru tegundir smávaxinna fiska.

Sértækur meðalvaxtarhraði í keri (r_2) skal teiknaður á línurit á móti styrk til þess að kanna sambandið milli styrks og svörunar.

Velja skal viðeigandi líkan til að setja fram venslin milli r_2 og styrksins og valið skal stutt tilhlýðilegum rökum.

Ef fjöldi fiska, sem lifir af, er mismunandi milli kera skal taka tillit þess að hóparnir eru misstórir með því að vega ferlið, hvort sem það er einfalt eða ólínulegt, sem er notað til að aðlaga líkanið.

Aðferðin, sem er notuð til að aðlaga líkanið, skal gera kleift að meta t.d. EC_{20} og finna dreifingu þess kringum gildið (annaðhvort staðalskekkju eða öryggisbil). Línurit aðlagaða líkansins skal sýnt í tengslum við gögnin svo að sjá megi hversu vel líkanið passar við gögnin (8., 18, 19. og 20. heimild).

2.1.2. **Greining niðurstaðna við mat á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC)**

Ef ker samhliða prófunar eru fyrir alla styrkleika í prófuninni skal matið á minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, byggjast á dreifnigreiningu á sértækum meðalvaxtarhraða í keri (sjá lið 2.1) sem fylgt er eftir með viðeigandi aðferð (t.d. Dunnetts- eða Williams-prófun (12., 13., 14. og 21. heimild)) til að bera meðalgildið fyrir r við hvern styrkleika saman við meðalgildið fyrir r fyrir samanburðarhópana til að finna minnsta styrkinn þar sem þessi munur er marktækur og líkindin eru 0,05. Ef nauðsynlegar forsendur fyrir stikabundnum aðferðum eru ekki uppfylltar, ekki eðlileg dreifing (t.d. Shapiro-Wilks-prófun) eða misleit dreifni (Bartletts-prófun), skal vega og meta hvort rétt sé að varpa gögnunum til að gera dreifnina einsleita, áður en dreifnigreiningin er gerð, eða að nota vegna dreifnigreiningu.

Ef ekki voru ker fyrir samhliða prófun fyrir hvern styrkleika verður dreifnigreining, sem grundvallast á kerum, ófullnægjandi eða ómöguleg. Við slíkar aðstæður er það viðunandi málamiðlun að dreifnigreiningin grundvallist á sýndarsértæka vaxtarhraðanum r_3 fyrir hvern einstakan fisk.

Síðan má bera meðalgildið fyrir r_3 við hvern styrkleika í prófuninni saman við meðalgildið fyrir r_3 fyrir samanburðarhópana. Síðan má finna minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, eins og áður. Nauðsynlegt er að átta sig á því að þessi aðferð gefur ekki kost á neinum frávikum frá, eða vernd gegn, breytileika milli kera umfram það sem gert er ráð fyrir vegna breytileika milli einstakra fiska. Reynslan hefur hins vegar sýnt (8. heimild) að breytileiki milli kera var mjög lítill miðað við breytileikann innan hvers kers (þ.e. milli fiska). Taki greiningin ekki til einstakra fiska skal tilgreina aðferðina, sem er valin til að finna einfara, og rökstyðja valið á henni.

2.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældir styrkleikar eiturefnisins í prófunarlausnunum eru nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar eða, ef um er að ræða hálfkyrrstöðuprófanir, ef styrkur prófunarefnisins minnkar frá því að lausnin er nýtilreidd og þar til hún er endurnýjuð.

2.3. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.3.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand og þeir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki og greiningaraðferð við magngreiningu prófunarefnisins, eftir því sem við á.

2.3.2. **Prófunartegundir:**

— vísindaheiti,

— stofn, stærð, birgir, formeðhöndlun, ef um hana er að ræða, o.s.frv.

2.3.3. **Prófunarskilyrði:**

— prófunaraðferðin sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun eða endurnýjunarprófun, gegnumstreymisprófun, hleðsla, þéttleiki fiska o.s.frv.),

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi prófunaríláta, fjöldi styrkleika í prófunum og samhliða prófunum og fjöldi fiska á ker),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal uppleysandi efnið og styrk þess ef það er notað),

— nafnstyrkleikar í prófuninni, meðaltal mældra gilda og staðalfrávik þeirra í prófunarílátunum og sú aðferð, sem er notuð til að reikna þessi gildi, og gögn sem sýna að mælingarnar vísa til raunverulegra styrkleika prófunarefnisins í eiginlegu lausninni,

— eiginleikar þynningarvatnsins: sýrustig, harka, basavirkni, hitastig, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir, selta prófunarmiðilsins (ef hún er mæld) og niðurstöður úr öllum öðrum mælingum sem eru gerðar,

— gæði vatns í prófunarílátum, sýrustig, harka, hiti og styrkur uppleysts súrefnis,

— nákvæmar upplýsingar um fóðrun (t.d. tegund eða tegundir fóðurs, uppruna fóðurs, magn, sem er gefið, og hve oft er gefið).

2.3.4. **Niðurstöður:**

— gögn sem sýna að samanburðarhópar uppfylli gildisviðmiðun um lifun og gögn um dauðsföll sem verða við mismunandi styrkleika,

— tölfræðilegar greiningaraðferðir, sem eru notaðar, tölfræðilegar upplýsingar sem byggjast á samhliða prófunum eða einstökum fiskum, vinnsla gagna og rökstuðningur fyrir þeim aðferðum sem eru notaðar,

— gögn í töflum um þyngd einstakra fiska og meðalþyngd fiska á degi 0, 14 (ef þá er vegið) og 28, meðalgildi fyrir hvert ker eða sýndarsértækur vaxtarhraði (eftir því sem við á) fyrir dag 0–28 eða dag 0–14 og dag 14–28,

— niðurstöður úr tölfræðilegri greiningu (þ.e. aðhvarfsgreiningu eða dreifnigreiningu), sem helst skal setja fram í töflum og myndrænt, ásamt minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, ($p = 0,05$) og styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif, eða EC_x ásamt staðalskekkju, verði því við komið og eftir því sem við á,

— öll tilvik þess að fiskur sýni óvenjulega svörun og öll sýnileg áhrif sem prófunarefnið kallar fram.

3. HEIMILDIR

1) Solbe J.F. de LG (1987) Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J., (1990) EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

3) Crossland N.O. (1985) A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, bls. 1855-1870.

4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B., (1991) Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (Brachydanio rerio): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, bls. 157-164.

5) Yamamoto, Tokio., (1975) Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

6) Holcombe, G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D., (1995) Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes).Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, bls. 287-297.

7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L., (1991) Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (Oryzias latipes). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.

8) Stephan C.E. and Rogers J.W., (1985) Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, bls. 328-338.

9) Environment Canada, (1992) Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or Atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, bls. 81.

10) Cox D.R., (1958) Planning of experiments. Wiley Edt.

11) Pack S., (1991) Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10- 12 December 1991.

12) Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc., 50, bls. 1096-1121.

13) Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, bls. 482-491.

14) Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, bls. 103-117.

15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T., (1994) A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, Oncorhynchus mykiss: effect of feeding level. Aquaculture 120, bls. 123-133.

16) Quinton, J. C. and Blake, R.W., (1990) The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Journal of Fish Biology, 37, bls. 33-41.

17) Post, G., (1987) Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. bls. 288.

18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J., (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, bls. 1485-1494.

19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O., (1989) Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.

20) Norbert-King T.J., (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. bls. 12.

21) Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, bls. 510-531.

1. viðbætir

FISKTEGUNDIR SEM MÆLT ER MEÐ TIL PRÓFUNAR OG PRÓFUNARSKILYRÐI SEM HÆFA

Tegund	Ráðlagt hitasvið í prófun (°C)	Ljóslotur (klst.)	Ráðlagt þyngdarsvið fiska í upphafi (g)	Tilskilin mælinákvæmni	Hleðsluhlutfall (g/l)	Þéttleiki fiska (í hverjum lítra)	Matur	Tímalengd prófunar (dagar)
Ráðlagðar tegundir:								
Oncorhynchus mykiss regnbogasilungur	12,5–16,0	12–16	1–5	að næstu 100 mg	1,2–2,0	4	Sérstakt þurrfóður, ætlað seiðum laxfiska	≥ 28
Aðrar mikið rannsakaðar tegundir:								
Danio rerio sebradanni	21–25	12–16	0,050–0,100	að næstu 1 mg	0,2–1,0	5–10	Lifandi fóður (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes rískarpi (Medaka)	21–25	12–16	0,050–0,100	að næstu 1 mg	0,2–1,0	5–20	Lifandi fóður (*Brachionus Artemia*)	≥ 28

2. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	Styrkur
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarstyrkur lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

3. viðbætir

Lograðar styrkleikaraðir sem henta fyrir eiturhrifaprófun (9)

Dálkur (fjöldi styrkleika milli 100 og 10 eða milli 10 og 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Velja má röð fimm (eða fleiri) styrkleika úr hverjum dálki. Miðpunktar milli styrkleika í dálki (x) finnast í dálki (2x + 1). Gildin í listanum geta staðið fyrir styrkleika sem eru gefnir sem hundraðshluti rúmmáls eða þyngdar (mg/l eða µg/l). Gildi má margfalda eða deila í þau með hvaða margfeldi sem er af 10 eftir því sem við á. Nota má dálk 1 ef veruleg óvissa ríkir um hve mikil eiturhrifin eru.

C.15. FISKUR, PRÓFUN Á SKAMMVINNUM EITURHRIFUM Á FÓSTURVÍSIS- OG KVIÐPOKASTIGI

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á skammvinnum eiturhrifum er eins og í OECD-viðmiðunarreglu 212 um prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Þessi prófun á skammvinnum eiturhrifum á fisk á fósturvísis- og kviðpokastigi er skammvinn prófun þar sem stigin í lífsferlinum frá nýfrjóvguðu hrogni til loka kviðpokastigsins eru látin verða fyrir váhrifum. Í prófuninni á fósturvísum og kviðpokaseiðum er ekkert fóður gefið og því skal ljúka prófuninni meðan kviðpokaseiðin taka enn næringu úr kviðpokanum.

Með prófuninni er ætlunin að skilgreina banvæn og, að einhverju leyti, nær banvæn áhrif efna á þessi sérstöku þroskastig og á þær tegundir sem prófaðar eru. Þessi prófun ætti að veita gagnlegar upplýsingar þar eð hún gæti: a) tengt saman prófanir á banvænum og næstum banvænum áhrifum, b) komið að gagni sem skimunarprófun, annaðhvort fyrir fullnaðarprófun á snemmkomnu stigi í lífsferlinum eða fyrir prófun á langvinnum eiturhrifum og c) nýst til að prófa tegundir þar sem tækni við eldi er ekki nægilega þróuð fyrir það tímabil þegar forðinn er upp urinn og seiðið fer að éta.

Það skal haft í huga að til jafnaðar veita aðeins þær prófanir, sem taka til allra stiga í lífsferli fisks, áreiðanlegt mat á langvinnum eiturhrifum íðefna á fisk og séu váhrifin látin ná til færri stiga í lífsferlinum er hætt við að næmið verði minna og langvinn eiturhrif verði að sama skapi vanmetin. Þess má því vænta að prófun á fósturvísum og kviðpokaseiðum sýni minna næmi en fullnaðarprófun á snemmkomnu stigi í lífsferlinum, einkum að því er varðar íðefni sem eru mjög fitusækin (log P_{ow} > 4) og efni með mjög sérhæfðan eiturefnafræðilegan verkunarmáta. Hins vegar er líklegt að minni munur verði á næmi prófananna tveggja ef um er að ræða íðefni með ósérhæfða, deyfandi verkun (1. heimild).

Fram að birtingu þessarar prófunar hefur mesta reynslan fengist af þessum prófunum á fósturvísum og kviðpokaseiðum ferskvatnsfisks af tegundinni *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – almennt heiti: sebradanni). Ítarlegri leiðbeiningar um framkvæmd prófunar með þessari tegund er að finna í 1. viðbæti. Þetta útilokar ekki notkun annarra tegunda sem reynsla er einnig af (tafla 1).

1.2. SKILGREININGAR

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): minnsti styrkur prófunarefnis þar sem efnið reynist hafa marktæk áhrif (við $p < 0,05$) miðað við samanburðinn. Í öllum prófunum, þar sem styrkur er meiri en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif, skal hann á hinn bóginn valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum, merkjanlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif.

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARINNAR

Fiskar á fósturvísis- og kviðpokastigi eru látnir verða fyrir váhrifum við tiltekið styrkleikasvið prófunarefnis sem er leyst upp í vatni. Í aðferðarlýsingunni er gefinn kostur á vali milli hálfkyrrstöðu-prófunar og gegnumstreymisprófunar. Valið ræðst af eðli prófunarefnisins. Prófunin hefst á því að frjóvguð hrogn eru látin í prófunarkerin og henni lýkur rétt áður en forði kviðpoka nokkurs seiðis í nokkru prófunarkeranna er algerlega upp urinn eða áður en hungurdauði gerir vart við sig í samanburðarhópum. Banvæn og nær banvæn áhrif eru metin og borin saman við gildi úr samanburðarhópum til að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og síðan styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Önnur aðferð til að greina áhrifin er að nota aðhvarfslíkan til að meta styrkinn sem gæti valdið tilteknum hundraðshlutum áhrifa (þ.e. LC/EC_x þar sem x er skilgreindur hundraðshluti áhrifa).

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturhrifum (sjá prófunaraðferð C. 1), sem á helst að hafa verið gerð á þeirri tegund sem valin var fyrir þessa prófun, skulu vera fyrirliggjandi. Niðurstöðurnar geta reynst gagnlegar við val á viðeigandi styrkleikasviði prófunar á snemmkomnum stigum í lífsferlinum. Leysni í vatni (þ.m.t. leysni í prófunarvatninu) og gufuþrýstingur prófunarefnis skulu vera þekkt. Fyrir skal liggja áreiðanleg aðferð til að mæla magn efnisins í prófunarlausnunum með þekktri og skráðri nákvæmni og greiningarmörkum.

Upplýsingar um prófunarefnið, sem eru gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki efnisins, stöðugleiki í ljósi, stöðugleiki við prófunarskilyrðin, pKa-gildi, P_{ow}-gildi og niðurstöður prófunar á auðlífbrjótanleika (sjá aðferð C.4).

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

— heildarlifun frjóvgaðra hrogna í samanburðarhópunum og, ef við á, í kerum, sem eru eingöngu með leysi, verður að vera yfir eða jöfn þeim mörkum sem eru skilgreind í 2. og 3. viðbæti,

— styrkur uppleysts súrefnis skal í allri prófuninni vera milli 60–100% af mettunargildi lofts,

— ekki má muna meira á vatnshitastiginu milli prófunarkera og frá degi til dags en ± 1,5 °C meðan á prófuninni stendur og skal hitinn vera innan þess hitasviðs sem er tilgreint fyrir prófunartegundina (2. og 3. viðbætir).

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Prófunarker**

Nota má ker úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Kerin skulu vera svo stór að unnt sé að uppfylla ákvæði um hleðsluhlutfall (sjá lið 1.7.1.2). Mælt er með því að prófunarkerunum sé komið fyrir af handahófi á prófunarsvæðinu. Handahófskennd tilhögun með samstæður af prófunarkerum, þar sem sérhver tegund meðhöndlunar er fyrir hendi í hverri samstæðu, er æskilegri en algerlega handahófskennd tilhögun ef kerfisbundinna áhrifa, sem má stjórna með slíkri hópatilhögun, gætir á rannsóknarstofunni. Taka skal tillit til hópatilhögunarinnar, ef hún er notuð, í greiningu gagna eftir á. Prófunarkerin skulu varin gegn óæskilegri truflun.

1.6.2. **Val á fisktegund**

Í töflu 1A eru tilgreindar þær fisktegundir sem mælt er með. Aðrar tegundir eru þó ekki útilokaðar (dæmi eru tilgreind í töflu 1B) en vera má að breyta þurfi prófunaraðferðinni svo að prófunarskilyrði verði við hæfi. Færa skal rök fyrir vali tegundarinnar og tilraunaaðferðarinnar í slíkum tilvikum.

1.6.3. **Eldi fisks til undaneldis**

Upplýsingar um eldi á undaneldisstofni við fullnægjandi skilyrði er að finna í OECD-viðmiðunarreglu 210 um prófanir (13. heimild) og í 2., 3., 4., 5. og 6. heimild.

1.6.4. **Meðhöndlun fósturvísa og seiða**

Láta má fósturvísana og seiðin verða fyrir váhrifum í smáum kerum sem eru með möskva á hliðum eða endum og komið fyrir í meginkerinu þannig að prófunarlausnin geti streymt um það. Framkalla má iðulaust streymi gegnum þessi smáu ker með því að hengja þau upp í arm sem komið er fyrir og hreyfir kerin upp og niður en þannig að lífverurnar eru ávallt í kafi; einnig má nota kerfi sem byggist á vökvasugu (e. *siphon-flush system*). Koma má frjóvguðum hrognum laxfiska fyrir á grindum eða möskvum með svo stórum opum að seiðin falli niður gegnum þau eftir klak. Pasteur-pípettur eru heppilegar til að fjarlægja fósturvísa og seiði í hálfkyrrstöðuprófunum þar sem alger endurnýjun fer fram daglega (sjá lið 1.6.6).

Ef hrognin hafa verið sett í hrognaker, á grindur eða möskva í meginprófunarílátinu skulu þessir tálmar teknir í burtu eftir klak seiðanna ([1]) en möskvunum skal þó haldið til að varna því að fiskurinn sleppi. Ef nauðsynlegt er að flytja seiðin skal þess gætt að loft leiki ekki um þau og ekki má nota net til að færa seiði úr hrognakerum (þessi varúð kann að vera óþörf ef um er að ræða tegundir sem eru ekki mjög viðkvæmar, t.d. karpa). Tímasetning þessa flutnings ræðst af tegundinni og ekki er víst að koma þurfi til flutnings. Ef notuð er hálfkyrrstöðuaðferð má nota bikarglös eða grunn ílát sem eru, ef nauðsyn krefur, búin neti sem er svolítið yfir botni bikarglassins. Ef rúmtak þessara íláta er nægilegt til að uppfylla megi kröfur um hleðsluhlutfall (sjá lið 1.7.1.2) má vera að ekki þurfi að flytja til fósturvísa eða seiði.

1.6.5. **Vatn**

Í prófuninni má nota allt vatn, sem hefur til að bera þá efnafræðilegu eiginleika viðunandi þynningarvatns, sem tilgreindir eru í 4. viðbæti og þar sem samanburðarhópar prófunartegundarinnar hafa a.m.k. jafngóða lifun og lýst er í 2. og 3. viðbæti. Gæði vatnsins skulu vera stöðug allan prófunartímann. Sýrustigið skal ekki sveiflast um meira en ± 0,5 pH-einingar.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, ‘Fish, Early-life Stage Toxicity Test’.

Til að tryggja að þynningarvatnið hafi ekki óæskileg áhrif á niðurstöður prófunarinnar (t.d. með því að mynda efnaflóka með prófunarefninu) eða að það hafi ekki skaðleg áhrif á undaneldisstofninn skal taka sýni til greiningar með reglulegu millibili. Mælingar skulu gerðar á þungmálmum (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjónum og mínusjónum (t.d. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO_4) og varnarefnum (t.d. heildarmagni fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagni lífræns kolefnis og heildarmagni svifagna, t.d. þriðja hvern mánuð ef vitað er að þynningarvatnið er tiltölulega stöðugt að gæðum. Ef sýnt hefur verið fram á að vatnsgæði hafi verið stöðug í a.m.k. eitt ár geta mælingar verið strjálli (t.d. á sex mánaða fresti).

1.6.6. **Prófunarlausnir**

Prófunarlausnir af þeim styrkleikum, sem valdir eru hverju sinni, fást með því að þynna stofnlausn.

Einfaldast er að tilreiða stofnlausnina með því að blanda eða hrista prófunarefnið saman við þynningarvatnið á vélrænan hátt (t.d. með hræri- eða úthljóðsbúnaði). Nota má mettunarsúlur (leysnisúlur) til að búa til stofnlausn af hæfilegum styrk. Varast skal, eftir því sem unnt er, að nota leysa eða dreifiefni (uppleysandi efni); í tilteknum tilvikum kann þó að vera nauðsynlegt að nota slík efnasambönd til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika. Heppilegir leysar eru t.d. aseton, etanól, metanól, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól. Heppileg dreifiefni eru m.a. Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% metýlsellulósi og HCO-40. Gæta skal varúðar ef notuð eru auðlífbrjótanleg efni (t.d. aseton) og/eða mjög rokgjörn efni þar eð þau geta skapað vanda vegna þess að bakteríur geta safnast fyrir í gegnumstreymisprófunum. Ef uppleysandi efni er notað skal það hvorki hafa marktæk áhrif á lifun né merkjanleg, skaðleg áhrif snemma í lífsferlinum en það skal kannað með samanburðarprófun þar sem eingöngu er notaður leysir. Í lengstu lög skal þó forðast notkun slíkra efna.

Ef notuð er hálfkyrrstöðuaðferð má velja milli tveggja verkferla við endurnýjun; annaðhvort: i) eru nýjar prófunarlausnir tilreiddar í hreinum kerum og eftirlifandi hrogn og seiði eru flutt varlega yfir í nýju kerin í litlu rúmmáli af gömlu lausninni og reynt að komast hjá því að loft leiki um þau eða ii) lífverurnar í prófuninni eru látnar vera eftir í kerunum meðan hluti (a.m.k. þrír fjórðu hlutar) prófunarvatnsins er endurnýjaður. Endurnýjun miðilsins skal ráðast af stöðugleika prófunarefnisins en mælt er með því að allt vatnið sé endurnýjað daglega. Ef áður gerðar forprófanir á stöðugleika (sjá lið 1.4) hafa leitt í ljós að styrkur prófunarefnisins er ekki stöðugur á endurnýjunartímabilinu (þ.e. utan bilsins 80–120% af nafnstyrk eða hann fellur niður fyrir 80% af mældum upphafsstyrk) skal vega það og meta hvort nota skuli gegnumstreymisprófun. Ávallt skal forðast að láta seiðin verða fyrir streitu við endurnýjun vatnsins.

Við gegnumstreymisprófun er nauðsynlegt að nota kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunarefninu og þynnir hana (t.d. skammtadælu, hlutfallsþynningarbúnað eða mettunarkerfi) og flytur raðir styrkleika í prófunarkerin. Kanna skal streymi stofnlausna og þynningarvatns reglulega, helst daglega, meðan prófunin stendur og í allri prófuninni skal frávik í streyminu ekki vera meira en 10%. Reynslan sýnir að streymi, sem jafngildir a.m.k. rúmmáli fimm prófunarkera á 24 klukkustundum, er hæfilegt (2. heimild).

1.7. VERKFERLI

Gagnlegar upplýsingar um útkomu fiskfósturvísa og kviðpokaseiða í eiturhrifaprófunum eru aðgengilegar í heimildum og vísað er í sumar þeirra í þessum texta (7., 8. og 9. heimild).

1.7.1. **Váhrifaskilyrði**

1.7.1.1. *Lengd*

Prófunin á helst að hefjast innan 30 mínútna eftir að hrognin frjóvgast. Fósturvísunum er sökkt í prófunarlausnina áður en klofnunarstig kímblöðrudisksins hefst, eða svo fljótt sem unnt er í kjölfar þess, og í öllum tilvikum áður en holfósturssstigið hefst. Ef hrognin eru fengin frá utanaðkomandi birgi getur verið ógerlegt að hefja prófunina strax eftir frjóvgun. Þar eð næmi prófunarinnar getur orðið fyrir verulegum áhrifum ef það dregst að prófunin hefjist skal prófunin hefjast innan átta klukkustunda eftir frjóvgun. Þar eð seiðin eru ekki fóðruð á váhrifatímabilinu skal stöðva prófunina rétt áður en forði kviðpoka nokkurs seiðis í nokkru keranna er upp urinn eða áður en hungurdauði gerir vart við sig í samanburðarhópunum. Lengd prófunar ræðst af þeirri tegund sem er notuð. Nokkur dæmi um æskilega lengd eru tilgreind í 2. og 3. viðbæti.

1.7.1.2. *Hleðsla*

Fjöldi frjóvgaðra hrogna í upphafi prófunarinnar skal vera nægur til að uppfylla tölfræðilegar kröfur. Hrognin skulu dreifast handahófskennt á meðhöndlunarhópana og nota skal a.m.k. 30 frjóvguð hrogn sem skulu dreifast jafnt (eða svo jafnt sem unnt er þar eð erfitt getur verið að fá fram jafna hópa hjá sumum tegundum) á a.m.k. þrjú ker samhliða prófana fyrir hvern styrkleika.

Hleðsluhlutfallið (lífmassi á rúmmálseiningu prófunarlausnar) skal ekki vera stærra en svo að styrkur uppleysts súrefnis haldist við a.m.k. 60% af mettunargildi lofts án loftunar. Í gegnumstreymisprófunum er mælt með því að hleðsluhlutfallið fari ekki yfir 0,5 g/l á 24 klukkustundum og ekki undir neinum kringumstæðum yfir 5 g/l lausnar (2. heimild).

1.7.1.3. *Ljós og hiti*

Haga skal ljóslotum og vatnshita þannig að henti þeirri tegund sem er prófuð (2. og 3. viðbætir). Við vöktun hitastigs getur verið heppilegt að nota aukaprófunarílát.

1.7.2. **Prófunarstyrkleikar**

Að jafnaði þarf fimm styrkleika prófunarefnisins með styrkbilsstuðul sem er ekki stærri en 3,2. Taka skal mið af ferlinum, sem tengir LC_{50} við váhrifatímabilið, þegar styrkleikasviðið er ákveðið fyrir prófun á bráðum eiturhrifum. Við sumar kringumstæður getur verið við hæfi að nota færri en fimm styrkleika, t.d. í markprófunum, og þrengra bil milli styrkleika. Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Ekki er nauðsyn á að prófa við styrkleika sem er meiri en sem nemur 96 klukkustunda LC_{50} eða 100 mg/l, eftir því hvor er minni. Efni skulu ekki prófuð við styrkleika sem er meiri en sem nemur leysnimörkum þeirra í prófunarvatninu.

Ef uppleysandi efni er notað sem hjálparefni þegar prófunarlausnir eru tilreiddar (sjá lið 1.6.6) skal lokastyrkur þess ekki vera meiri en 0,1 ml/l og hann skal vera sá sami í öllum prófunarílátunum.

1.7.3. **Samanburður**

Með prófunarröðinni skal hafa samanburðarker með þynningarvatni (og ker samhliða prófana eftir því sem við á) og einnig, ef við á, samanburðarker með uppleysandi efninu (og ker samhliða prófana eftir því sem við á).

1.7.4. **Tíðni magngreininga og mælinga**

Í prófuninni er styrkur prófunarefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili.

Ef um er að ræða hálfkyrrstöðuprófun, þar sem þess er vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk (þ.e. innan bilsins 80–120%, sjá liði 1.4 og 1.6.6) er mælt með því að mesti og minnsti prófunarstyrkleiki skuli að lágmarki ákvarðaður á nýtilreiddum lausnum og strax á undan endurnýjun lausnanna í minnst þrjú skipti sem dreifast jafnt á prófunina (þ.e. efnagreiningar skulu gerðar á sýnum úr sömu lausninni: þegar hún er nýtilreidd og við endurnýjun).

Ef um er að ræða prófanir þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk (út frá stöðugleikagögnum um prófunarefnið) er nauðsynlegt að ákvarða prófunarstyrkleika allra lausna þegar þær eru nýtilreiddar og við endurnýjun þeirra en fylgja sama fyrirkomulagi (þ.e. í minnst þrjú skipti sem dreifast jafnt á prófunina). Ekki þarf að ákvarða styrk prófunarefnis á undan endurnýjun nema í einu keri í samhliða prófun fyrir hvern prófunarstyrk. Ekki skulu líða meira en sjö dagar milli ákvarðana á styrkleika. Mælt er með því að niðurstöðurnar séu byggðar á mældum styrkleikum. Ef unnt er að sýna fram á að styrkur prófunarefnisins í lausn hafi haldist á fullnægjandi hátt innan markanna ± 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni mega niðurstöðurnar þó grundvallast á nafngildum eða mældum upphafsgildum.

Ef um er að ræða gegnumstreymisprófanir hentar að nota sömu sýnatökuáætlun og lýst er fyrir hálfkyrrstöðuprófanir (en mælingar á „gömlum“ lausnum eiga ekki við í þessu tilviki). Standi prófun hins vegar lengur en í sjö daga er ráðlegt að auka fjölda þeirra skipta þar sem sýni eru tekin í fyrstu vikunni (t.d. þrjú sett mælinga) til að tryggja að styrkleikar í prófuninni haldist stöðugir.

Ef til vill þarf að sía sýni (t.d. með síu með opstærðinni 0,45 μm) eða setja þau í skilvindu. Þar eð hvorki skiljun í skilvindu né síun virðast alltaf skilja þann hluta prófunarefnisins, sem er ekki lífaðgengilegur, frá þeim sem er lífaðgengilegur skulu sýni ekki meðhöndluð þannig.

Í prófuninni skal mæla uppleyst súrefni, sýrustig og hita í öllum prófunarílátum. Mæla skal heildarhörku og seltu (ef við á) í samanburðarkerunum og í einu keri þar sem styrkurinn er mestur. Uppleyst súrefni og selta (ef við á) skulu hið minnsta mæld þrisvar sinnum (í upphafi prófunar, í henni miðri og í lokin).

Í hálfkyrrstöðuprófunum er mælt með að uppleyst súrefni sé mælt oftar, helst fyrir og eftir hverja endurnýjun á vatni eða minnst einu sinni í viku. Sýrustig skal mæla við upphaf og lok hverrar vatnsendurnýjunar í hálf-kyrrstöðuprófun og minnst vikulega í gegnumstreymisprófunum. Harka skal mæld einu sinni í hverri prófun. Hitinn skal mældur daglega og helst á að vakta hann stöðugt í a.m.k. einu prófunaríláti.

1.7.5. **Athuganir**

1.7.5.1. *Stig fósturvísisþroskunar*

Fósturvísisstigið (þ.e. holfóstursstigið), sem ríkir í upphafi þegar fósturvísarnir eru fyrst látnir verða fyrir váhrifum frá prófunarefninu, skal sannreynt svo nákvæmlega sem unnt er. Þetta má gera með því að rannsaka dæmigert úrtak hrogna sem hafa verið meðhöndluð á viðeigandi hátt og gerð gagnsæ. Einnig má finna lýsingu og teikningar af fósturvísisstigum í heimildum (2., 5., 10. og 11. heimild).

1.7.5.2. *Klak og lifun*

Athuganir á klaki og lifun skulu gerðar a.m.k. daglega og niðurstöður skráðar. Æskilegt getur verið að hafa athuganir tíðari í upphafi prófunar (t.d. á 30 mínútna fresti fyrstu 3 klst.) þar eð lifunartími getur í sumum tilvikum skipt meira máli en bara fjöldi dauðsfalla (t.d. ef um bráð eiturhrif er að ræða). Dauðir fósturvísar og seiði skulu fjarlægð um leið og eftir þeim er tekið þar eð þau geta sundrast hratt. Ítrustu varúðar skal gætt þegar dauðir fósturvísar eða seiði eru fjarlægð til að rekast ekki í eða skaða nálæg hrogn eða seiði því að þau eru einstaklega fíngerð og viðkvæm. Viðmiðanir fyrir dauða eru breytilegar eftir stigi lífsferils:

— **hrogn**: greinileg minnkun á gagnsæi og litarbreyting, einkum á fyrstu stigum, sem orsakast af kekkjun og/eða útfellingu prótína og veldur því að þau verða hvít og ógagnsæ,

— **fyrir fósturvísa:** engin hreyfing og/eða enginn hjartsláttur og/eða ógagnsæ litaráferð í tegundum þar sem fósturvísarnir eru að jafnaði hálfgagnsæir,

— **seiði**: hreyfingarleysi og/eða engar öndunarhreyfingar og/eða enginn hjartsláttur og/eða hvít og mött litaráferð miðtaugakerfisins og/eða engin viðbrögð við líkamlegu áreiti.

1.7.5.3. *Óeðlilegt útlit*

Með hæfilegu millibili, sem ræðst af lengd prófunar og eðli þess afbrigðileika sem er lýst, skal skrá fjölda seiða, sem eru óeðlileg að því er varðar líkamsgerð og/eða litarhátt, og hvernig gengur á forða kviðpokans. Hafa skal í huga að afbrigðilegir fósturvísar og seiði koma fyrir í náttúrunni og geta verið allmargir hundraðshlutar í samanburðarhópi eða -hópum hjá sumum tegundum. Afbrigðileg dýr skulu eingöngu fjarlægð úr prófunarílátum eftir dauða þeirra.

1.7.5.4. *Afbrigðilegt atferli*

Afbrigðileiki, t.d. oföndun, ósamstillt sund og ódæmigerð ró, skal skráður með hæfilegu bili sem ræðst af lengd prófunarinnar. Þótt erfitt sé að meta umfang þessara atriða geta þau, þegar þau koma í ljós, auðveldað túlkun á gögnum um dánarhlutfall, þ.e. gefið upplýsingar um eiturefnafræðilegan verkunarmáta efnisins.

1.7.5.5. *Lengd*

Mælt er með því að lengd einstaklinga sé mæld; mæla má staðallengd, sýlingarlengd eða heildarlengd. Mæla skal staðallengd ef sporðuggarots eða uggaeyðingar gætir. Í vel útfærðum prófunum skal frávikstuðull lengdar í samhliða prófunum hjá samanburðarhópum að jafnaði vera ≤ 20%.

1.7.5.6. *Vog*

Í lok prófunarinnar má vega einstaklingana; þurrvigt (24 klst. við 60 °C) er æskilegri en blautvigt (þerraðir með pappír). Í vel útfærðum prófunum skal frávikstuðull þyngdar í samhliða prófunum hjá samanburðarhópum að jafnaði vera ≤ 20%.

Úr þessum athugunum verða sum eða öll eftirfarandi gögn tiltæk til tölfræðilegrar greiningar:

— uppsöfnuð afföll,

— fjöldi heilbrigðra seiða í lok prófunar,

— tíminn þegar klak hefst og þegar því lýkur (þ.e. 90% klak í hverju keri samhliða prófunar),

— fjöldi seiða sem klekst á degi hverjum,

— lengd (og þyngd) eftirlifandi dýra í lok prófunar,

— fjöldi vanskapaðra seiða eða seiða sem eru óeðlileg í útliti,

— fjöldi seiða sem sýnir afbrigðilegt atferli.

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Mælt er með því að tölfræðingur komi bæði að útfærslu og greiningu prófunarinnar þar eð þessi aðferð gefur kost á talsverðum breytileika í tilhögun tilraunarinnar, t.d. að því er varðar fjölda prófunarkera, fjölda mismunandi prófunarstyrkleika og fjölda frjóvgaðra hrogna í upphafi og að því er varðar mæliþættina. Í ljósi þess hve margbreytileg tilhögun prófunarinnar getur verið verða ekki gefnar hér sértækar leiðbeiningar um tölfræðilegar aðferðir.

Ef ákvarða á minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, eða styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif, er nauðsynlegt að greina breytileika innan hverrar samstæðu samhliða prófana og nota dreifnigreiningu eða aðferð með tengslatöflum. Aðferð Dunnetts (12. og 13. heimild) getur reynst gagnleg í tengslum við margfaldan samanburð á niðurstöðum við mismunandi styrkleika og niðurstöðum fyrir samanburðarhópa. Dæmi eru einnig um aðrar gagnlegar aðferðir (14. og 15. heimild). Reikna skal og greina frá umfangi þeirra áhrifa sem unnt er að greina með dreifnigreiningu eða öðrum aðferðum (þ.e. styrk prófunarinnar). Vakin skal athygli á því að athuganirnar, sem eru tilgreindar í lið 1.7.5.6, henta ekki allar til tölfræðilegrar greiningar með dreifnigreiningu. Til dæmis má greina uppsöfnuð afföll og fjölda heilbrigðra seiða í lok prófunar með því að beita probit-aðferðum.

Ef meta á LC/EC_x skal laga viðeigandi feril eða ferla, t.d. umhverfðan veldisvísisferil, að viðkomandi gögnum með því að beita tölfræðilegri aðferð, s.s. aðferð minnstu kvaðrata eða ólínulegri aðferð minnstu kvaðrata. Ferillinn eða ferlarnir skulu stikaðir (e. *parameterised*) þannig að meta megi viðkomandi LC/EC_x og staðalskekkjuna beint. Þetta auðveldar til muna reikning á öryggismörkum fyrir LC/EC_x. Ef ekki eru gild rök fyrir því að velja önnur öryggismörk skal tilgreina tvíhliða 95% öryggismörk. Aðferðin, sem er notuð við að laga ferilinn að gögnunum, skal helst gera kleift að meta hve mikið ferillinn víkur frá gögnunum. Nota má myndrænar aðferðir við ferilaðlögun. Aðhvarfsgreining hentar fyrir allar athuganirnar sem eru tilgreindar í lið 1.7.5.6.

2.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældur styrkur eiturefnisins í prófunarlausnunum er nálægt greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar. Niðurstöður fyrir styrkleika, sem eru yfir leysni efnisins í vatni, skulu einnig túlkaðar með varfærni.

2.3. PRÓFUNARSKÝRSLAN

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.3.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand og þeir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki og greiningaraðferð við magngreiningu prófunarefnisins, eftir því sem við á.

2.3.2. **Prófunartegundir:**

— vísindaheiti, stofn, fjöldi klakfiska (e. *parental fish*) (þ.e. hve margar hrygnur voru notaðar til að fá tilskilinn fjölda hrogna fyrir prófunina), uppruni frjóvguðu hrognanna og aðferð við að afla þeirra og meðhöndlun þeirra eftir það.

2.3.3. **Prófunarskilyrði:**

— prófunaraðferðin sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymisprófun, tími frá frjóvgun til upphafs prófunar, hleðsla o.s.frv.),

— ljóslota eða ljóslotur,

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi prófunarkera og kera samhliða prófana, fjöldi fósturvísa á hvert ker í samhliða prófun),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal uppleysandi efnið og styrk þess ef það er notað),

— nafnstyrkleikar í prófuninni, mældu gildin, meðaltöl þeirra og staðalfrávik í prófunarílátunum og aðferðin sem notuð var til að fá þessi gildi, og ef prófunarefnið er leysanlegt í vatni við styrkleika sem eru minni en þeir sem eru notaðir í prófuninni skal leggja fram gögn sem sýna að mælingarnar vísa til styrkleika prófunarefnisins í lausninni,

— eiginleikar þynningarvatnsins: sýrustig, harka, hiti, styrkur uppleysts súrefnis, styrkur klórleifa (ef hann er mældur), heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir, selta prófunarmiðilsins (ef hún er mæld) og niðurstöður úr öllum öðrum mælingum sem eru gerðar,

— gæði vatns í prófunarílátum, sýrustig, harka, hiti og styrkur uppleysts súrefnis.

2.3.4. **Niðurstöður:**

— niðurstöður úr öllum forrannsóknum á stöðugleika prófunarefnisins,

— sönnun fyrir því að heildarlifun dýranna í samanburðarhópunum uppfylli staðalinn fyrir prófunartegundina (2. og 3. viðbætir),

— gögn um dauðsföll/lifun á fósturvísis- og seiðastigi og heildardauðsföll/heildarlifun,

— fjöldi daga fram að klaki og fjöldi sem klekst,

— gögn um lengd (og þyngd),

— hlutfall formfræðilegs afbrigðileika og lýsing á honum, ef um hann er að ræða,

— hlutfall tilvika þar sem áhrif á atferli koma fram og lýsing á þeim, ef um slíkt er að ræða,

— tölfræðileg greining og úrvinnsla gagna,

— fyrir prófanir þar sem dreifnigreiningu er beitt: minnsti styrkur, sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC) við p = 0,05, og styrkur, sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC), fyrir hverja svörun sem er metin, þ.m.t. lýsing á þeim tölfræðiaðferðum, sem eru notaðar, og tilgreining á umfangi þeirra áhrifa sem unnt er að greina,

— fyrir prófanir þar sem aðhvarfsgreiningu er beitt: LC/EC_x og öryggisbil og línurit aðlagaða líkansins sem er notað við útreikninginn,

— skýring á hvers kyns fráviki frá þessari prófunaraðferð.

3. **HEIMILDIR**

1) Kristensen P., (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, bls. 60. June 1990.

2) ASTM (1988) Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. bls. 26

3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A., (1975) Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. bls. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

4) Brungs W.A. and Jones B.R., (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures bls. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

5) Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, bls. 121-173.

6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, bls. 328-330.

7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T., (1987) Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (Brachydanio rerio) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, bls. 61-71.

8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G., (1985) Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, bls. 807-821.

9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, bls. 129-145.

10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969) Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976) The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. bls. 36.

12) Dunnett C.W., (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, bls. 1096-1121.

13) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, bls. 482-491.

14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G., (1980) Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J., (1990) Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, bls. 321-334.

16) Environment Canada., (1992) Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, bls. 81.

17) Dave G. and Xiu R., (1991) Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, Brachydanio rerio. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, bls. 126-134.

18) Meyer A., Bierman C.H. and Orti G., (1993) The phylogenetic position of the Zebrafish (Danio rerio), a model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P., (1995) Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, bls. 19-28.

20) US EPA, (1991) Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, Oryzias latipes. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

21) US EPA, (1991) Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (Oryzias latipes). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D., (1991) Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, bls. 1189-1203.

23) Calow P., (1993) Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

24) Balon E.K., (1985) Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, bls. 280.

25) Blaxter J.H.S., (1988) Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, bls. 1-58.

Tafla 1A

Fisktegundir sem eru heppilegar til prófunar

FERSKVATN
Oncorhynchus mykiss
Regnbogasilungur (9)(16)
Danio rerio
Sebradanni (7)(17)(18)
Cyprinus caprio
Vatnakarpi (8)(19)
Oryzias latipes
Japanskur rískarpi/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas
Breiðkollur (8)(22)

Tafla 1B

Dæmi um aðrar vel rannsakaðar tegundir sem hafa mikið verið notaðar

FERSKVATN	SALTVATN
Carassius auratus	*Menidia peninsulae*
Gullfiskur (8. heimild)	Silfurlax (23., 24. og 25. heimild)
Lepomis macrochirus	*Clupea harengus*
Blátálkni (8. heimild)	Síld (24. og 25. heimild)
	Gadus morhua
	Þorskur (24. og 25. heimild)
	Cyprinodon variegatus
	Vatnakarfi (23., 24. og 25. heimild)

1. viðbætir

LEIÐBEININGAR UM FRAMKVÆMD EITURHRIFAPRÓFUNAR Á FÓSTURVÍSUM OG KVIÐPOKASEIÐUM SEBRADANNA (BRACHYDANIO RERIO)

INNGANGUR

Sebradanni á sér heimkynni á Coromandel-strönd Indlands og lifir þar m.a. í straumhörðum ám. Þetta er algengur búrfiskur af ætt vatnakarpa og upplýsingar um aðferðir við umhirðu hans og ræktun finnast í algengum uppsláttarritum um hitabeltisfiska. Laale (1. heimild) hefur tekið saman yfirlit yfir líffræði hans og notkun hans í fiskrannsóknum.

Fiskurinn verður sjaldan lengri en 45 mm. Bolurinn er sívalur og með 7–9 dökkbláum, silfruðum, láréttum rákum. Rákirnar ná út í sporðinn og eru líka á raufarugganum. Á baki er hann ólífugrænn. Hængarnir eru grennri en hrygnurnar. Hrygnurnar eru meira silfurgljáandi en hængarnir og kviðurinn þandari, einkum rétt fyrir hrygningu.

Fullvaxnir fiskar þola miklar sveiflur í hita, sýrustigi og hörku vatns. Hins vegar skal skapa fiskunum kjörskilyrði til þess að fá heilbrigða fiska sem skila góðum hrognum.

Við hrygninguna eltir hængurinn hrygnuna og hnubbar hana og frjóvgar eggin jafnharðan og hún gýtur þeim. Hrognin eru glær og loða ekki saman og falla til botns og foreldrarnir eiga það til að éta þau. Birta hefur áhrif á hrygninguna. Ef birta er næg að morgni hrygna fiskarnir venjulega á fyrstu klukkustundunum eftir dagrenningu.

Hrygna getur hrygnt nokkur hundruðum hrogna í senn á nokkurra vikna fresti.

SKILYRÐI VARÐANDI KLAKFISK, ÆXLUN OG FYRSTU ÞROSKASTIG

Velja skal hæfilegan fjölda heilbrigðra fiska og halda þá í vatni við hæfi (t.d. 4. viðauki) í a.m.k. tvær vikur fyrir fyrirhugaða hrygningu. Þessi hópur fiska skal látinn hrygna a.m.k. einu sinni áður en hann hrygnir þeim hrognum sem notuð verða í prófuninni. Þéttleiki fiskanna á þessu tímabili skal ekki vera meiri en 1 gramm fisks á hvern lítra. Þéttleikinn getur verið meiri ef vatnið er endurnýjað reglulega eða hreinsikerfi er notað. Hitastiginu í eldiskerunum skal haldið við 25 ± 2 °C. Fiskurinn á að fá fjölbreytt fóður sem getur verið t.d. þurrfóður við hæfi, lifandi og nýklakin saltrækja, mýflugulirfur, halaflær og pottormar (*Enchytraeidea*).

Tvær aðferðir eru tilgreindar hér á eftir sem hafa reynst geta skilað nægilega mörgum heilbrigðum, frjóvguðum hrognum til að nota í prófun.

i. Átta hrygnur og 16 hængar eru sett í ker með 50 lítrum af þynningarvatni, varin gegn beinu ljósi og látin vera í svo miklu næði sem kostur er í a.m.k. 48 klukkustundir. Hrygningarbakka er komið fyrir á botni kersins síðdegis daginn áður en prófunin á að hefjast. Hrygningarbakkinn er rammi (úr plexígleri eða öðru heppilegu efni), 5–7 cm hár með 2–5 mm grófu neti efst og 10–30 µm fínriðnu neti í botni. Fjöldi „hrygningartrjáa“ úr nælonbandi, sem er ekki snúið saman, er festur við grófa netið í bakkanum. Þegar fiskarnir hafa verið í myrkri í 12 klukkustundir er kveikt dauft ljós sem kemur hrygningunni af stað. Hrygningarbakkinn er fjarlægður tveimur til fjórum klukkustundum eftir að hrygningu lýkur og hrognin tekin. Hrygningarbakkinn varnar því að fiskurinn éti hrognin og auðveldar jafnframt að safna saman hrognunum. Hópurinn skal hafa hrygnt a.m.k. einu sinni áður en hann hrygnir þeim hrognum sem notuð eru til prófunar.

ii. Fimm til tíu hængum og hrygnum er haldið hverju fyrir sig í a.m.k. tvær vikur áður en þeim er ætlað að hrygna. Að liðnum 5–10 dögum er kviður hrygnanna orðinn þaninn og kyntoturnar (e. *genital papillae*) sjást. Engar totur af þessu tagi eru á hængunum. Hrygningin fer fram í hrygningarkerum sem eru búin fölskum netbotni (sjá hér fyrir framan). Tankurinn er fylltur með þynningarvatni þannig að vatnsdýptin fyrir ofan netið sé 5-10 cm. Eitt kvendýr og tvö karldýr eru sett í tankinn daginn fyrir fyrirhugaða hrygningu. Hiti vatnsins er hækkaður smám saman þannig að hann verði einni gráðu hærri en hann var í aðlöguninni. Lýsing er tekin af og kerið er látið vera í svo miklu næði sem kostur er. Að morgni er dauft ljós kveikt og það kemur hrygningunni af stað. Eftir 2– 4 klukkustundir eru fiskarnir fjarlægðir og hrognunum safnað. Ef nota þarf fleiri hrogn en fást úr einni hrygnu má bæta við hliðstæðum kerum eins og þarf. Með því að skrá árangur hrygningar hjá hverri hrygnu, áður en kemur að prófuninni (fjölda hrogna og gæði), er unnt að velja til undaneldis þær hrygnur sem skiluðu bestu hrygningunni.

Hrognin á að flytja yfir í prófunarílátin í glerpípu (innanmál ekki minna en 4 mm) með þjálum sogbelg. Taka skal eins lítið vatn með hrognunum í flutningnum og framast er kostur. Hrognin eru eðlisþyngri en vatn, verða neðst í pípunni og koma því fyrst út. Þess skal vandlega gætt að hrogn (og seiði) komist ekki í snertingu við loft. Rannsaka skal sýni af hrognunum í smásjá til að ganga úr skugga um að enginn afbrigðileiki komi fram á fyrstu þroskastigunum. Óleyfilegt er að sótthreinsa hrognin.

Hrognadauðinn er mestur fyrstu 24 klukkustundirnar eftir frjóvgun. Á þessu tímabili drepast iðulega 5– 40% hrognanna. Hrognin hrörna vegna þess að frjóvgun tekst ekki eða galli kemur fram í þroskun. Gæði hrognanna virðast komin undir hrygnunni þar eð sumar hrygnur mynda stöðugt góð hrogn en aðrar aldrei. Hlutfall hrogna, sem þroskast, og klakhlutfall eru enn fremur mismunandi eftir hrygningarlotum. Lifun hrogna, sem frjóvgast eðlilega, og kviðpokaseiða er góð, venjulega yfir 90%. Við 25 °C klekjast hrognin 3–5 dögum eftir frjóvgun og kviðpokinn verður horfinn um 13 dögum eftir frjóvgun.

Hisaoka og Battle (2. heimild) hafa lýst fósturþroskuninni ítarlega. Sökum þess að hrognin eru gagnsæ, svo og seiðin fyrst eftir klak, má fylgjast með þroskuninni og greina vansköpun komi hún fram. Um fjórum klukkustundum eftir hrygningu má greina ófrjóvguð egg frá frjóvguðum (3. heimild). Við þessa rannsókn eru hrogn og seiði sett í lítil prófunarílát og skoðuð í smásjá.

Prófunarskilyrði, sem hæfa fyrir snemmkomnu stigin í lífsferlinum, eru tilgreind í 2. viðbæti. Kjörgildi fyrir pH-gildi er 7,8 og fyrir hörku þynningarvatns er kjörgildið 250 mg CaCO3/l.

ÚTREIKNINGAR OG TÖLFRÆÐILEGAR UPPLÝSINGAR

Lagt er til að tveggja þrepa aðferð verði notuð. Fyrst er unnin tölfræðigreining á gögnum um dauðsföll, óeðlilega þroskun og klaktíma. Bollengd er síðan metin tölfræðilega fyrir þá styrkleika þar sem engin merkjanleg, skaðleg áhrif koma fram í neinum þessara mæliþátta. Mælt er með þessari aðferð þar eð hugsanlegt er að eiturefnið drepi fremur smáan fisk, valdi seinkun klaks og framkalli umtalsverða vansköpun sem hefur þannig í för með sér skekkju í mælingum á lengd. Auk þess eru mælingar gerðar á u.þ.b. sama fjölda fiska fyrir hverja meðhöndlun sem tryggir gildi tölfræðigreiningarinnar í prófuninni.

ÁKVÖRÐUN Á LC_{50} OG EC_{50}

Hundraðshluti eftirlifandi hrogna og seiða er reiknaður og leiðréttur með tilliti til dauðsfalla í samanburðarhópunum í samræmi við formúlu Abbotts (4. heimild):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

þar sem:

P = leiðrétt lifun í %

P' = mæld lifun í % við prófunarstyrkleikann

C = lifun í samanburðarhópnum

Ef unnt er skal í lok prófunarinnar ákvarða LC_{50} með viðeigandi aðferð.

Stephan (5. heimild) hefur sett fram leiðbeiningar um það hvernig formfræðilegur afbrigðileiki er tekinn með í tölfræðilegri vinnslu fyrir EC_{50} ef sóst er eftir því.

MAT Á MINNSTA STYRK SEM HEFUR MERKJANLEG ÁHRIF (LOEC) OG STYRK SEM HEFUR ENGIN MERKJANLEG ÁHRIF (NOEC)

Markmiðið með prófun á hrognum og kviðpokaseiðum er að bera styrkleika yfir núlli saman við samanburðarhópinn, þ.e. að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Af þeim sökum skal beita aðferð með margföldum samanburði (6., 7., 8., 9. og 10. heimild).

HEIMILDIR

1) Laale H.W., (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, bls. 121-173.

2) Hisaoka K.K. and Battle H.I., (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, bls. 311.

3) Nagel R., (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, bls. 173-181.

4) Finney D.J., (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, bls. 1-333.

5) Stephan C.E., (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, bls. 69-81.

6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, bls. 1096-1121.

7) Dunnett C.W., (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, bls. 482-491.

8) Williams D.A., (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, bls. 103-117.

9) Williams D.A., (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, bls. 519-531.

10) Sokal R.R. and Rohlf F.J., (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

2. viðbætir

PRÓFUNARSKILYRÐI, LENGD PRÓFUNAR OG VIÐMIÐANIR FYRIR LIFUN ÞEIRRAR TEGUNDAR SEM MÆLT ER MEÐ

Tegund	Hitastig (°C)	Selta (0/00)	Ljóslota (klst.)	Tímalengd stiga (dagar)		Dæmigerð lengd prófunar	Lifun í samanburðarhóp, (lágmark, í %)	
				Fósturvísir	Kviðpokaseiði		Árangur í klaki	Eftir klak
FERSKVATN								
Brachydanio rerio								
Sebradanni	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til fimm daga eftir klak (8–10 dagar).	80	90
Oncorhynchus mykiss								
Regnbogasilungur	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (3)	30–35	25–30	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 20 daga eftir klak (50–55 dagar)	66	70
Cyprinus carpio								
Vatnakarpi	21–25	—	12–16	5	> 4	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 4 daga eftir klak (8–9 dagar)	80	75
Oryzias latipes								
Japanskur rískarpi/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12–16	8–11	4–8	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 5 daga eftir klak (13–16 dagar)	80	80
Pimephales promelas Breiðkollur	25 ± 2	—	16	4–5	5	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 4 daga eftir klak (8–9 dagar)	60	70

(1) Fyrir fósturvísa.

(2) Fyrir seiði.

(3) Fósturvísar og seiði í myrkri þar til vika er liðin frá klaki nema meðan þau eru tekin til skoðunar. Síðan dauf lýsing til loka prófunarinnar.

3. viðbætir

Prófunarskilyrði, lengd prófunar og viðmiðanir fyrir lifun annarra mikið rannsakaðra tegunda

Tegund	Hitastig (°C)	Selta (0/00)	Ljóslota (klst.)	Tímalengd stiga (dagar)		Dæmigerð lengd prófunar á fósturvísum og kviðpokaseiðum	Lifun í samanburðarhópum, (lágmark, í %)	
				Fósturvísir	Prófun á kviðpokaseiðum		Árangur í klaki	Eftir klak
FERSKVATN								
Carassius auratus Gullfiskur	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til fjögurra daga eftir klak (7 dagar).	—	80
Lepomis macrochirus Blátálkna sólborri	21 ± 1	—	16	3	> 4	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til fjögurra daga eftir klak (7 dagar).	—	75
SALTVATN								
Menidia peninsulae Fjöruæringi	22–25	15–22	12	1,5	10	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 5 daga eftir klak (6–7 dagar)	80	60
Clupea harengus Síld	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 3 daga eftir klak (23–27 dagar)	60	80
Gadus morhua Þorskur	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til þriggja daga eftir klak (18 dagar).	60	80
Cyprinodon variegatus Kjammakerplingur	25 ± 1	15–30	12	—	—	Svo fljótt sem unnt er að lokinni frjóvgun (snemma á holfóstursstigi) til 4–7 daga eftir klak (28 dagar).	> 75	80

4. viðbætir

NOKKRIR EFNAFRÆÐILEGIR EIGINLEIKAR VIÐUNANDI ÞYNNINGARVATNS

Efni	Styrkur
Efnisagnir	< 20 mg/l
Heildarstyrkur lífræns kolefnis	< 2 mg/l
Ójónað ammoníak	< 1 µg/l
Klórleifar	< 10 µg/l
Heildarstyrkur fosfórlífrænna varnarefna	< 50 ng/l
Heildarstyrkur klórlífrænna varnarefna ásamt fjölklóruðum bífenýlum	< 50 ng/l
Heildarstyrkur lífræns klórs	< 25 ng/l

C.16. BÝFLUGUR — BRÁÐ EITURHRIF VIÐ INNGJÖF UM MUNN

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á bráðum eiturhrifum er eins og í OECD-viðmiðunarreglu 213 fyrir prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Þessi eiturhrifaprófun er rannsóknarstofuaðferð og er ætluð til að meta bráð eiturhrif plöntuverndarvara og annarra íðefna á fullvaxnar býflugnaþernur við inngjöf um munn.

Við mat og ákvörðun á eitureiginleikum efna getur ákvörðun á bráðum eiturhrifum á býflugur við inngjöf um munn verið nauðsynleg, t.d. ef líklegt er að býflugur verði fyrir váhrifum af tilteknu íðefni. Prófun á bráðum eiturhrifum við inngjöf um munn er gerð til að ákvarða eðlislæg eiturhrif varnarefna og annarra íðefna á býflugur. Niðurstöður úr þessari prófun skulu notaðar til að meta þörf á frekari rannsóknum. Þessa aðferð má einkum nota í þrepskiptum áætlunum um mat á hættum sem býflugum stafar af varnarefnum en þessar áætlanir byggjast á raðbundinni framvindu frá eiturhrifaprófunum á rannsóknarstofu til tilrauna sem eru að hálfu leyti og síðan að öllu leyti vettvangsrannsóknir (1. heimild). Prófa má varnarefnin í formi virkra efna eða samsettra vara.

Nota skal staðaleiturefni til að sannreyna hversu viðkvæmar býflugurnar eru og nákvæmni prófunaraðferðarinnar.

1.2. SKILGREININGAR

Bráð eiturhrif við inngjöf um munn: skaðleg áhrif sem koma fram innan 96 klst. að hámarki eftir inngjöf á stökum skammti prófunarefnis.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er tekið inn. Skammtur er gefinn upp sem massi (µg) prófunarefnis á hvert tilraunadýr (µg á hverja býflugu). Ekki er unnt að reikna raunskammt fyrir hverja býflugu þar eð þær eru fóðraðar allar í einu en meðalskammtinn má meta (heildarmagn inntekins prófunarefnis á fjölda prófaðra býflugna í hverju búri).

LD_{50} (miðgildisbanaskammtur) við inngjöf um munn: tölfræðilega reiknaður, stakur skammtur efnis sem getur dregið 50% tilraunadýranna til dauða þegar hann er gefinn um munn. Miðgildisbanaskammturinn (LD_{50}) er gefinn upp í µg prófunarefnis á hverja býflugu. Þegar um varnarefni er að ræða getur prófunarefnið annaðhvort verið virkt efni eða samsett vara með einu eða fleirum virkum efnum.

Dauðsfall: dýr er skráð dautt ef það er algerlega hreyfingarlaust.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Fullvaxnar býflugnaþernur (*Apis mellifera*) eru látnar verða fyrir váhrifum af misstórum skömmtum prófunarefnis sem er leyst upp í súkrósalausn. Býflugurnar fá síðan sama fóðrið en án prófunarefnisins. Dauðsföll eru skráð daglega í a.m.k. 48 klst. og borin saman við samanburðargildi. Ef dánarhlutfallið eykst á tímabilinu milli 24 klst. og 48 klst. en dánarhlutfall í samanburðarhópum helst í viðunandi horfi, þ.e. $\leq$ 10%, er rétt að framlengja prófunina þannig að hún vari að hámarki í 96 klst. Niðurstöðurnar eru greindar til að reikna út LD_{50} við 24 klst. og 48 klst. og, ef rannsóknin er framlengd, við 72 klst.

1.4. GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

— meðaldánarhlutfall í samanburðarhópunum má ekki vera meira en 10% við lok prófunar,

— gildi fyrir miðgildisbanastyrk staðaleiturefnisins er innan tilskilinna marka.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Öflun býflugna**

Nota skal ungar fullvaxnar býflugnaþernur af sama kynþætti, þ.e. býflugur á sama aldri, í sama næringarástandi, o.s.frv. Býflugna skal afla frá búum með frjósama drottningu, sem eru hæfilega fóðruð, heilbrigð, laus við sjúkdóma eftir því sem hægt er og með þekkta sögu og lífeðlisfræðilega stöðu. Býflugunum má safna saman að morgni, áður en á að nota þær, eða að kvöldi daginn fyrir prófun og þeim skal þá haldið við prófunarskilyrði fram til næsta dags. Nota má býflugur sem eru teknar úr römmum þar sem er ekkert ungviði. Forðast skal að afla býflugna snemma vors eða síðla hausts þar eð þær taka þá lífeðlisfræðilegum breytingum. Ef nauðsynlegt er að gera prófanir snemma vors eða síðla hausts má setja býflugurnar í hitaskáp og ala þær þar í eina viku á „býflugnabrauði“ (frjókornum, teknum úr býkúpunni) og súkrósalausn. Býflugur, sem hafa verið meðhöndlaðar með sýklalyfjum, lyfjum gegn varróaveiki eða öðrum efnum, skulu ekki notaðar til eiturhrifaprófana í fjórar vikur eftir að síðustu meðhöndlun lauk.

1.5.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Nota skal búr með góðri loftun sem er auðvelt að þrífa. Nota má hvaða hentugt efni sem er, t.d. ryðfrítt stál, vírnet eða plast, eða einnota timburbúr, o.s.frv. Æskileg hópstærð í búri er 10 býflugur. Stærð prófunarbúranna skal vera hæfileg miðað við fjölda býflugnanna, þ.e. þau eiga að vera nægilega rúmgóð.

Býflugurnar skulu vera í myrkri í tilraunastofu við hitastigið 25 ± 2 °C. Loftrakinn, sem að jafnaði er 50–70%, skal skráður í allri prófuninni. Meðferðin, þ.m.t. meðhöndlun og skoðun, getur farið fram í (dags)birtu. Súkrósalausn í vatni með lokastyrknum 500 g/l (50% massa miðað við rúmmál) er notuð til að fóðra býflugurnar. Þegar prófunarskammtar hafa verið gefnir skulu býflugurnar fá fóður að vild. Fóðrunarkerfið skal vera þannig að unnt sé að skrá fóðurát fyrir hvert búr (sjá lið 1.6.3.1). Nota má glerpípu (u.þ.b. 50 mm langa og 10 mm í þvermál sem mjókkar í opna endann niður í um 2 mm þvermál).

1.5.3. **Býflugurnar undirbúnar**

Býflugunum er deilt af handahófi á prófunarbúrin og búrunum er komið af handahófi fyrir í tilrauna-stofunni.

Svelta má býflugurnar í allt að 2 klst. áður en prófunin hefst. Mælt er með því að býflugurnar séu sveltar fyrir meðferðina svo að þær standi allar jafnt að vígi að því er varðar innihald í meltingarfærum við upphaf prófunarinnar. Býflugur, sem eru að dauða komnar, skulu teknar frá áður en prófunin hefst og í stað þeirra skal setja heilbrigðar býflugur.

1.5.4. **Tilreiðsla skammta**

Ef prófunarefnið er blandanlegt með vatni má leysa það beint upp í 50% súkrósalausn. Ef um er að ræða tæknilegar vörur og efni, sem leysast illa í vatni, má nota burðarefni á borð við lífræna leysa,ýruefni eða dreifiefni sem eru lítið eitruð fyrir býflugur (t.d. aseton, dímetýlformamíð og dímetýlsúlfoxíð). Styrkur burðarefnisins ræðst af leysni prófunarefnisins og ætti að vera hinn sami við alla styrkleika sem notaðir eru í prófuninni. Yfirleitt hentar að hafa styrk burðarefnisins 1% og hann ætti ekki að vera meiri en sem því nemur.

Tilreiða skal viðeigandi samanburðarlausnir, þ.e. ef leysir eða dreifiefni er notað til að leysa upp prófunarefnið skal nota tvo mismunandi samanburðarhópa: fyrir lausn í vatni og fyrir súkrósalausn með leysinum/burðarefninu í styrknum sem notaður er í skammtalausnunum.

1.6. VERKFERLI

1.6.1. **Prófunar- og samanburðarhópar**

Fjöldi skammta í prófun og samhliða prófun skal valinn þannig að fullnægt sé tölfræðilegum kröfum fyrir ákvörðun á LD_{50} með 95% öryggismörkum. Venjulega er nauðsynlegt að nota fimm skammta sem eru í jafnhlutfallaröð, með stuðli sem er ekki yfir 2,2, og ná yfir svið fyrir LD_{50}. Þynningarstuðulinn og fjölda skammtastyrkleika verður þó að ákvarða út frá halla eiturhrifaferilsins (skammtur á móti dánarhlutfalli) og með hliðsjón af þeirri tölfræðilegu aðferð sem er valin til að greina niðurstöðurnar. Skammtastærðarprófun gerir kleift að velja viðeigandi styrkleika á skömmtum.

Þrír hópar að lágmarki, hver með tíu býflugum, skulu prófaðir samhliða við hvern styrkleika prófunarinnar. Þrjár samanburðarlotur að lágmarki, hver með tíu býflugum, skulu prófaðir til viðbótar hinni prófunarröðinni. Samanburðarlotur skulu einnig vera fyrir þá leysa eða þau burðarefni sem eru notuð (sjá lið 1.5.4).

1.6.2. **Staðaleiturefni**

Í prófuninni skal nota staðaleiturefni. Velja skal a.m.k. þrjá skammta til að ná yfir það gildi á LD_{50} sem búast má við. Nota skal a.m.k. þrjú búr, hvert með tíu býflugum, við samhliða prófun fyrir hvern skammt. Dímetóat er mest notað sem staðaleiturefni og uppgefið gildi þess fyrir LD_{50} (24 klst. eftir inntöku) er á bilinu 0,10–0,35 µg virks efnis á býflugu (2. heimild). Önnur staðaleiturefni (t.d. paraþíón) koma þó til greina ef næg gögn liggja fyrir til að sannreyna megi þau tengsl milli skammts og svörunar sem búist er við.

1.6.3. **Váhrif**

1.6.3.1. *Gjöf skammta*

Hver hópur býflugna, sem er prófaður, skal fá 100–200 µl af 50% súkrósalausn í vatni og í henni skal vera prófunarefni af viðeigandi styrkleika. Ef um er að ræða efni með minni leysni eða minni eiturhrif eða sem eru í minni styrk í samsetningunni þarf meira rúmmál þar eð nota þarf hlutfallslega meira magn í súkrósalausnina. Fylgjast skal með magni meðhöndlaðs fóðurs sem hver hópur innbyrðir. Þegar allt er upp urið (venjulega innan 3–4 klst.) skal fóðurgjafinn fjarlægður úr búrinu og í stað hans settur annar sem er með hreinni súkrósalausn. Súkrósalausnin er síðan í boði að vild. Þegar um er að ræða tiltekin efnasambönd getur mikill styrkur orðið til þess að býflugurnar fúlsa við þeim og taka til sín lítið af skammtinum eða alls ekkert. Eftir ekki lengri tíma en 6 klst. skal fjarlægja meðhöndlað fóður, sem eftir er, og setja í staðinn hreina súkrósalausn. Magn þess meðhöndlaða fóðurs sem var innbyrt skal metið (t.d. með því að mæla rúmmál/þyngd þess meðhöndlaða fóðurs sem verður eftir).

1.6.3.2. *Lengd*

Prófunin skal helst vara í 48 klst. eftir að hrein súkrósalausn hefur verið sett í stað prófunarlausnarinnar. Ef dánarhlutfall heldur áfram að aukast um meira en 10% að liðnum fyrstu 24 klst. skal prófunin framlengd þannig að hún verði að hámarki 96 klst., að því tilskildu að dánarhlutfall í samanburðarhópum fari ekki yfir 10%.

1.6.4. **Athuganir**

Dauðsföll eru skráð 4 klst. eftir að prófunin hefst og síðan þegar liðnar eru 24 klst. og 48 klst. (þ.e. frá því að skammturinn var gefinn). Ef þörf er á lengri athugunartíma skal frekara mat gert á 24 klst. fresti þar til 96. klst. eru liðnar að hámarki, að því tilskildu að dánarhlutfall í samanburðarhópnum fari ekki yfir 10%.

Meta skal magn fóðurs sem hver hópur innbyrðir. Samanburður á því hve hratt gengur á meðhöndlað og ómeðhöndlað fóður á þeim 6 klst., sem eru tilgreindar, getur gefið upplýsingar um bragðgæði meðhöndlaða fóðursins.

Skrá skal allt óeðlilegt atferli sem kemur fram við athuganir á býflugunum á prófunartímabilinu.

1.6.5. **Markprófun**

Í sumum tilvikum (t.d. þar sem búist er við að eiturhrif prófunarefnisins séu lítil) má framkvæma markprófun þar sem notuð eru 100 µg virks efnis á hverja býflugu í því skyni að sýna fram á að LD_{50} sé stærra en þetta gildi. Nota skal sömu aðferð, þ.m.t. að hafa þrjá hópa samhliða prófana fyrir prófunarskammtinn, viðeigandi samanburðarhópa, mat á magni þess meðhöndlaða fóðurs sem er innbyrt og nota skal staðaleiturefni. Ef dauðsföll verða skal gera fullnaðarrannsókn. Verði vart nær banvænna áhrifa (sjá lið 1.6.4) skulu þau skráð.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

2.1. GÖGN

Gögnin skulu tekin saman og sett fram í töfluformi og þar skal koma fram fyrir hvern meðferðarhóp, svo og samanburðarhópa og hópa, sem fá staðaleiturefni, fjöldi býflugna sem er notaður, dánarhlutfall á hverju athugunartímabili og fjöldi býflugna sem sýnir óvenjulegt atferli. Greina skal dánargögn með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu, hlaupandi meðaltali eða tvíliðulíkindum (3. og 4. heimild). Teikna skal ferla skammtasvörunar fyrir hvern tímapunkt, þar sem mælt er með að athugun fari fram, og reikna skal halla ferlanna og miðgildisbanaskammta (LD_{50}) með 95% öryggismörkum. Leiðréttingar fyrir dauðsföll í samanburðarhópum skulu gerðar með því að nota aðferð Abbotts við leiðréttingu (4. og 5. heimild). Ef meðhöndlaða fóðrið klárast ekki algerlega skal reikna skammt prófunarefnis sem hver hópur innbyrðir. Gildi LD_{50} skal gefið upp í µg prófunarefnis á hverja býflugu.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli (t.d. stöðugleiki í vatni og gufuþrýstingur),

— efnafræðileg sanngreiningargögn, m.a. byggingarformúla og hreinleiki (þ.e. auðkenni og styrkleiki virks efnis eða virkra efna ef um varnarefni er að ræða).

2.2.2. **Prófunartegundir:**

— vísindaheiti, stofn, námundaður aldur (í vikum), aðferð við öflun og dagsetning þegar býflugnanna var aflað,

— upplýsingar um bú sem voru notuð við öflun býflugnanna sem eru notaðar til prófunar, þ.m.t. um heilbrigði, sjúkdóma fullvaxinna flugna, hvers kyns formeðhöndlun o.s.frv.

2.2.3. **Prófunarskilyrði:**

— hitastig og rakastig í tilraunastofunni,

— aðbúnaður, þ.m.t. tegund og stærð búra og efni sem þau eru úr,

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og prófunarlausna (ef leysir er notaður skal tilgreina hann og styrk hans),

— tilhögun prófunar, t.d. fjöldi prófunarstyrkleika og stærð þeirra og fjöldi samanburðarhópa; fyrir hvern prófunarstyrkleika og samanburðarhóp skal tilgreina fjölda búra í samhliða prófunum og fjölda býflugna á hvert búr,

— dagsetning prófunar.

2.2.4. **Niðurstöður:**

— niðurstöður úr forprófun til að ákvarða skammtastærðir, ef hún var gerð,

— óunnin gögn: dánarhlutfall við hvern skammt sem er prófaður á hverjum athugunartíma,

— línurit sem sýnir ferlana fyrir skammtasvörun við lok prófunar,

— gildi LD_{50} með 95% öryggismörkum fyrir hvern ráðlagðan athugunartíma, bæði fyrir prófunarefni og staðaleiturefni,

— tölfræðilegar aðferðir sem eru notaðar við ákvörðun á LD_{50},

— dánarhlutfall í samanburðarhópum,

— önnur líffræðileg einkenni sem koma fram við skoðun eða mælingar, t.d. óeðlilegt atferli býflugnanna (þ.m.t. ef þær fúlsa við prófunarskammtinum) og það hve hratt gengur á fóðrið í meðhöndluðu og ómeðhöndluðu hópunum,

— hvers kyns frávik frá þeirri aðferð við prófun, sem er lýst hér, og allar aðrar upplýsingar sem skipta máli.

3. **HEIMILDIR**

1) EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. March 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, bls. 119-125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, bls. 99-113.

4) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5) Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, bls. 265-267.

C.17. BÝFLUGUR — BRÁÐ EITURHRIF VIÐ SNERTINGU

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð við prófun á bráðum eiturhrifum er eins og í OECD-viðmiðunarreglu 214 fyrir prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Þessi eiturhrifaprófun er rannsóknarstofuaðferð og er ætluð til að meta bráð eiturhrif plöntuverndarvara og annarra íðefna á fullvaxnar býflugnaþernur við snertingu.

Við mat og ákvörðun á eitureiginleikum efna getur ákvörðun á bráðum eiturhrifum á býflugur við snertingu verið nauðsynleg, t.d. ef líklegt er að býflugur verði fyrir váhrifum af tilteknu íðefni. Prófun á bráðum eiturhrifum við snertingu er gerð til að ákvarða eðlislæg eiturhrif varnarefna og annarra íðefna á býflugur. Niðurstöður úr þessari prófun skulu notaðar til að meta þörf á frekari rannsóknum. Þessa aðferð má einkum nota í þrepskiptum áætlunum um mat á hættum sem býflugum stafar af varnarefnum en þessar áætlanir byggjast á raðbundinni framvindu frá eiturhrifaprófunum á rannsóknarstofu til tilrauna sem eru að hálfu leyti og síðan að öllu leyti vettvangsrannsóknir (1. heimild). Prófa má varnarefnin í formi virkra efna eða samsettra vara.

Nota skal staðaleiturefni til að sannreyna hversu viðkvæmar býflugurnar eru og nákvæmni prófunaraðferðarinnar.

1.2. SKILGREININGAR

Bráð eiturhrif við snertingu: skaðleg áhrif sem koma fram innan 96 klst. að hámarki eftir að stakur skammtur prófunarefnis hefur verið borinn á staðbundið svæði.

Skammtur: það magn prófunarefnis sem er borið á. Skammtur er gefinn upp sem massi (μg) prófunarefnis á hvert tilraunadýr (μg á hverja býflugu).

LD_{50} (miðgildisbanaskammtur) við snertingu: tölfræðilega reiknaður, stakur skammtur efnis sem getur dregið 50% tilraunadýranna til dauða sé hann borinn á þau. Miðgildisbanaskammturinn (LD_{50}) er gefinn upp í μg prófunarefnis á hverja býflugu. Þegar um varnarefni er að ræða getur prófunarefnið annaðhvort verið virkt efni eða samsett vara með einu eða fleirum virkum efnum.

Dauðsfall: dýr er skráð dautt ef það er algerlega hreyfingarlaust.

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Fullvaxnar býflugnaþernur (*Apis mellifera*) eru látnar verða fyrir váhrifum af misstórum skömmtum prófunarefnis sem er leyst upp í viðeigandi burðarefni og borið beint á frambolinn (í litlum dropum). Lengd prófunarinnar er 48 klst. Ef dánarhlutfallið eykst á tímabilinu milli 24 klst. og 48 klst. en dánarhlutfall í samanburðarhópum helst í viðunandi horfi, þ.e. < 10%, er rétt að framlengja prófunina þannig að hún vari að hámarki í 96 klst. Dauðsföll eru skráð daglega og borin saman við samanburðargildi. Niðurstöðurnar eru greindar í því skyni að reikna LD_{50} við 24 klst. og 48 klst. og, ef rannsóknin er framlengd, við 72 klst. og 96 klst.

1.4. GILDI PRÓFUNARINNAR

Prófunin gildir því aðeins að eftirfarandi skilyrði séu uppfyllt:

— meðaldánarhlutfall í samanburðarhópunum má ekki vera meira en 10% við lok prófunar,

— gildi fyrir miðgildisbanastyrk staðaleiturefnisins er innan tilskilinna marka.

1.5. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.5.1. **Öflun býflugna**

Nota skal ungar fullvaxnar býflugnaþernur, þ.e. býflugur á sama aldri, í sama næringarástandi, o.s.frv. Býflugna skal afla frá búum með frjósama drottningu, sem eru hæfilega fóðruð, heilbrigð, laus við sjúkdóma eftir því sem hægt er og með þekkta sögu og lífeðlisfræðilega stöðu. Býflugunum má safna saman að morgni, áður en á að nota þær, eða að kvöldi daginn fyrir prófun og þeim skal þá haldið við prófunarskilyrði fram til næsta dags. Nota má býflugur sem eru teknar úr römmum þar sem er ekkert ungviði. Forðast skal að afla býflugna snemma vors eða síðla hausts þar eð þær taka þá lífeðlisfræðilegum breytingum. Ef nauðsynlegt er að gera prófanir snemma vors eða síðla hausts má setja býflugurnar í hitaskáp og ala þær þar í eina viku á „býflugnabrauði“ (frjókornum, teknum úr býkúpunni) og súkrósalausn. Býflugur, sem hafa verið meðhöndlaðar með sýklalyfjum, lyfjum gegn varróaveiki eða öðrum efnum, skulu ekki notaðar til eiturhrifaprófana í fjórar vikur eftir að síðustu meðhöndlun lauk.

1.5.2. **Aðbúnaður og fóðrun**

Nota skal búr með góðri loftun sem er auðvelt að þrífa. Nota má hvaða hentugt efni sem er, t.d. ryðfrítt stál, vírnet eða plast, eða einnota timburbúr, o.s.frv. Stærð prófunarbúranna skal vera hæfileg miðað við fjölda býflugnanna, þ.e. þau eiga að vera nægilega rúmgóð. Í hverju búri á helst að vera hópur tíu býflugna.

Býflugurnar skulu vera í myrkri í tilraunastofu við hitastigið 25 ± 2 °C. Loftrakinn, sem að jafnaði er 50–70%, skal skráður í allri prófuninni. Meðferðin, þ.m.t. meðhöndlun og skoðun, getur farið fram í (dags)birtu. Súkrósalausn í vatni með lokastyrknum 500 g/l (50% massa miðað við rúmmál) skal notuð sem fóður og vera í boði að vild á prófunartímanum, gefin úr fóðurgjafa fyrir býflugur. Nota má glerpípu (u.þ.b. 50 mm langa og 10 mm í þvermál sem mjókkar í opna endann niður í um 2 mm þvermál).

1.5.3. **Býflugurnar undirbúnar**

Áður en prófunarefnið er borið á má deyfa býflugurnar með koltvísýringi eða köfnunarefni. Magn deyfilyfsins og lengd váhrifa skal vera í lágmarki. Býflugur, sem eru að dauða komnar, skulu teknar frá áður en prófunin hefst og í stað þeirra skal setja heilbrigðar býflugur.

1.5.4. **Tilreiðsla skammta**

Prófunarefnið skal borið á sem lausn í burðarefni, þ.e. lífrænum leysi eða vatnslausn með blotefni (e. *wetting agent*). Af lífrænum leysum er aseton æskilegast en nota má aðra lífræna leysa sem eru lítt eitraðir fyrir býflugur (t.d. dímetýlformamíð eða dímetýlsúlfoxíð). Ef um er að ræða vatnsleysanlegar, samsettar vörur og mjög skautuð, lífræn efni, sem eru ekki leysanleg í lífrænum leysiefnum, getur verið auðveldara að bera þau á ef þau eru tilreidd í veikri lausn með blotefnum sem eru á markaði (t.d. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton eða Tween).

Tilreiða skal viðeigandi samanburðarlausnir, þ.e. ef leysir eða dreifiefni er notað til að leysa upp prófunarefnið skal nota tvo mismunandi samanburðarhópa: einn, sem er meðhöndlaður með vatni, og annan sem er meðhöndlaður með leysi/dreifiefni.

1.6. VERKFERLI

1.6.1. **Prófunar- og samanburðarhópar**

Fjöldi skammta í prófun og samhliða prófun skal valinn þannig að fullnægt sé tölfræðilegum kröfum fyrir ákvörðun á LD_{50} með 95% öryggismörkum. Venjulega er nauðsynlegt að nota fimm skammta sem eru í jafnhlutfallaröð, með stuðli sem er ekki yfir 2,2, og ná yfir svið fyrir LD_{50}. Fjölda skammta verður að þó ákvarða út frá halla eiturhrifaferilsins (skammtur á móti dánarhlutfalli) og með hliðsjón af þeirri tölfræðilegu aðferð sem er valin til að greina niðurstöðurnar. Skammtastærðarprófun gerir kleift að velja viðeigandi skammta.

Þrír hópar að lágmarki, hver með tíu býflugum, skulu prófaðir samhliða við hvern styrkleika prófunar-innar.

Þrjár samanburðarlotur að lágmarki, hver með tíu býflugum, skulu prófaðir til viðbótar hinni prófunarröðinni. Ef notaður er lífrænn leysir eða blotefni skal hafa þrjár samanburðarlotur til viðbótar, hver með tíu býflugum, fyrir leysinn eða blotefnið.

1.6.2. **Staðaleiturefni**

Í prófuninni skal nota staðaleiturefni. Velja skal a.m.k. þrjá skammta til að ná yfir það gildi á LD_{50} sem búast má við. Nota skal a.m.k. þrjú búr, hvert með tíu býflugum, við samhliða prófun fyrir hvern skammt. Dímetóat er mest notað sem staðaleiturefni og uppgefið gildi fyrir LD_{50} (24 klst. eftir snertingu) er á bilinu 0,10– 0,30 µg virks efnis á býflugu (2. heimild). Önnur staðaleiturefni (t.d. paraþíón) koma þó til greina ef næg gögn liggja fyrir til að sannreyna megi þau tengsl milli skammts og svörunar sem búist er við.

1.6.3. **Váhrif**

1.6.3.1. *Gjöf skammta*

Býflugurnar, sem hafa verið deyfðar, eru teknar hver fyrir sig og borið á tiltekinn hluta líkamans. Býflugurnar eru valdar af handahófi fyrir mismunandi prófunarskammta og samanburðarhópa. Lausn, sem er 1 µl að rúmmáli og inniheldur prófunarefnið í hæfilegum styrkleika, er borin með örstjöku (e. *microapplicator*) á baklægan frambol hverrar býflugu. Rúmmálið getur verið annað en þetta en þá skal færa rök fyrir því. Þegar borið hefur verið á býflugurnar skal flytja þær aftur í prófunarbúrin og sjá þeim fyrir súkrósalausn.

1.6.3.2. *Lengd*

Prófunin skal helst vara í 48 klst. Ef dánarhlutfall eykst um meira en 10% frá því að liðnar eru 24–48 klst. skal prófunin framlengd þannig að hún verði að hámarki 96 klst., að því tilskildu að dánarhlutfall í samanburðarhópnum fari ekki yfir 10%.

1.6.4. **Athuganir**

Dánartíðni er skráð 4 klst. eftir skömmtun og síðan eftir 24 klst. og 48 klst. Ef þörf er á lengri athugunartíma skal frekara mat gert á 24 klst. fresti, að því tilskildu að dánarhlutfall í samanburðarhópnum fari ekki yfir 10%.

Skrá skal allt óeðlilegt atferli sem kemur fram við athuganir á býflugunum á prófunartímabilinu.

1.6.5. **Markprófun**

Í sumum tilvikum (t.d. þar sem búist er við að eiturhrif prófunarefnisins séu lítil) má framkvæma markprófun þar sem notuð eru 100 µg virks efnis á hverja býflugu í því skyni að sýna fram á að LD_{50} sé stærra en þetta gildi. Nota skal sömu aðferð, þ.m.t. að hafa þrjá hópa samhliða prófana fyrir prófunarskammtinn og viðeigandi samanburðarhópa og nota staðaleiturefni. Ef dauðsföll verða skal gera fullnaðarrannsókn. Verði vart nær banvænna áhrifa (sjá lið 1.6.4) skulu þau skráð.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

2.1. GÖGN

Gögnin skulu tekin saman og sett fram í töfluformi og þar skal koma fram fyrir hvern meðferðarhóp, svo og samanburðarhópa og hópa, sem fá staðaleiturefni, fjöldi býflugna sem er notaður, dánarhlutfall á hverju athugunartímabili og fjöldi býflugna sem sýnir óvenjulegt atferli. Greina skal dánargögn með viðeigandi tölfræðiaðferðum (t.d. probit-greiningu, hlaupandi meðaltali eða tvíliðulíkindum (3. og 4. heimild). Teikna skal ferla skammtasvörunar fyrir hvern tímapunkt, þar sem mælt er með að athugun fari fram (þ.e. að liðnum 24 klst., 48 klst. og, ef við á, að liðnum 72 klst. og 96 klst.), og reikna skal halla ferlanna og miðgildisbanaskammta (LD_{50}) með 95% öryggismörkum. Leiðréttingar fyrir dauðsföll í samanburðarhópum skulu gerðar með því að nota aðferð Abbotts við leiðréttingu (4. og 5. heimild). Gildi LD_{50} skal gefið upp í µg prófunarefnis á hverja býflugu.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli (t.d. stöðugleiki í vatni og gufuþrýstingur),

— efnafræðileg sanngreiningargögn, m.a. byggingarformúla og hreinleiki (þ.e. auðkenni og styrkleiki virks efnis eða virkra efna ef um varnarefni er að ræða).

2.2.2. **Prófunartegundir:**

— vísindaheiti, stofn, námundaður aldur (í vikum), aðferð við öflun og dagsetning þegar býflugnanna var aflað,

— upplýsingar um bú sem voru notuð við öflun býflugnanna sem eru notaðar til prófunar, þ.m.t. um heilbrigði, sjúkdóma fullvaxinna flugna, hvers kyns formeðhöndlun o.s.frv.

2.2.3. **Prófunarskilyrði:**

— hitastig og rakastig í tilraunastofunni,

— aðbúnaður, þ.m.t. tegund og stærð búra og efni sem þau eru úr,

— aðferð við gjöf prófunarefnisins, t.d. hvaða leysiefni er notað, rúmmál prófunarlausnar sem er notað, deyfilyf sem er notað,

— tilhögun prófunar, t.d. fjöldi og stærðir prófunarskammta og fjöldi samanburðarhópa; fyrir hvern prófunarskammt og samanburðarhóp skal tilgreina fjölda búra í samhliða prófunum og fjölda býflugna á hvert búr,

— dagsetning prófunar.

2.2.4. **Niðurstöður:**

— niðurstöður úr forprófun til að ákvarða skammtastærðir, ef hún var gerð,

— óunnin gögn: dánarhlutfall við hvern styrkleika sem er prófaður á hverjum athugunartíma,

— línurit sem sýnir ferlana fyrir skammtasvörun við lok prófunar,

— gildi LD_{50} með 95% öryggismörkum fyrir hvern ráðlagðan athugunartíma, bæði fyrir prófunarefni og staðaleiturefni,

— tölfræðilegar aðferðir sem eru notaðar við ákvörðun á LD_{50},

— dánarhlutfall í samanburðarhópum,

— önnur líffræðileg einkenni, sem koma fram við athugun eða mælingar, og hvers kyns óeðlileg svörun hjá býflugunum,

— hvers kyns frávik frá þeirri aðferð við prófun, sem er lýst hér, og allar aðrar upplýsingar sem skipta máli.

3. **HEIMILDIR**

1) EPPO/Council of Europe (1993) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, bls. 151-165. March, 1993.

2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B., (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (Apis mellifera L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, bls. 119-125.

3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, bls. 99-113.

4) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

5) Abbott, W.S., (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, bls. 265-267.

C.18. ÁSOG/AFSOG MEÐ HRISTI- OG SKILVINDUAÐFERÐ

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD TG 106, „Determination of Soil Adsorption/Desorption, using a Batch Equilibrium Method“ (2000).

1.1. INNGANGUR

Í þessari aðferð er höfð hliðsjón af hringprófun og vinnufundi um val á jarðvegi í því skyni að þróa ásogsprófun (1.–4. heimild) og einnig af gildandi leiðbeiningum á landsvísu (5.–11. heimild).

Rannsóknir á ásogi/afsogi eru gagnlegar til að afla mikilvægra upplýsinga um hreyfanleika íðefna og dreifingu þeirra í jarðvegi, vatni og lofti í lífhvolfinu (12.–21. heimild). Nota má upplýsingarnar til að spá fyrir um eða meta t.d. tiltækileika íðefnis til niðurbrots (22.–23. heimild), ummyndunar og upptöku í lífverum (24. heimild), útskolunar í jarðvegsþversniði (16., 18.–19., 21. og 25.–28. heimild), rokgirni úr jarðvegi (21. og 29.–30. heimild) og rennslis af yfirborði lands í náttúrulegt vatn (18. og 31. –32. heimild). Hægt er að nota gögn um ásog til að gera samanburð og búa til líkön (19. og 33.–35. heimild).

Dreifing íðefnis milli jarðvegs og vatnsfasa er flókið ferli sem er háð fjölda mismunandi þátta: efnafræðilegum eiginleikum efnisins (12. og 36.–40. heimild), eiginleikum jarðvegsins (4.,12.–14. og 41.–49. heimild) og loftslagsþáttum, s.s. regni, hitastigi, sólskini og vindi. Þeim fjölmörgu fyrirbærum og gangvirkjum sem koma við sögu í ásogsferli íðefnis í jarðvegi verður því ekki lýst til fulls með einfölduðu rannsóknarstofulíkani á borð við þessa aðferð. Þótt þessi tilraun nái ekki yfir allar hugsanlegar umhverfisaðstæður veitir hún mikilvægar upplýsingar um ásog íðefnis í umhverfislegu tilliti.

Sjá einnig almennan inngang.

1.2. GILDISSVIÐ

Markmiðið með aðferðinni er að meta ásog/afsog efna í jarðvegi. Takmarkið er að finna gildi fyrir sog sem hægt er að nota til að spá fyrir um skiptinguna við mismunandi umhverfisaðstæður; í þessu skyni eru ákvarðaðir jafnvægisstuðlar fyrir ásog fyrir íðefni í mismunandi jarðvegi sem fall af eiginleikum jarðvegsins (t.d. innihald lífræns kolefnis, leirinnihald og kornastærð jarðvegs og sýrustig. Nota verður mismunandi jarðvegsgerðir til að spanna eins vel og kostur er vixlverkun tiltekins efnis og jarðvegsgerða í náttúrunni.

Í þessari aðferð táknar ásog ferlið þar sem íðefni binst við yfirborð jarðvegsagna; í henni er ekki greint milli mismunandi ásogsferla (eðlisfræðilegs og efnafræðilegs ásogs) eða ferla á borð við yfirborðshvatað niðurbrot, massaásog (e. *bulk adsorption*) eða efnahvörf. Ekki er tekið með í reikninginn ásog á svifagnir (þvermál < 0,2 μm) sem myndast í jarðveginum.

Mæliþættirnir sem talið er að skipti mestu máli í tengslum við ásog í jarðvegi eru: innihald lífræns kolefnis (3.–4., 12.–14., 41., 43.–48. heimild), leirinnihald og kornastærð jarðvegs (3.–4., 41.–48. heimild) og sýrustig jónanlegra efnasambanda (3.–4. og 42. heimild). Aðrir jarðvegsmæliþættir, sem gætu haft áhrif á ásog/afsog tiltekins efnis eru virk plúsjónaskiptageta (ECEC), innihald myndlausra járn- og áloxíða, einkum í jarðvegi á eldfjallasvæðum og í hitabeltinu (4. heimild), svo og sérstakt yfirborð (49. heimild).

Markmiðið með prófuninni er að meta ásog íðefnis í mismunandi jarðvegsgerðum þar sem innihald lífræns kolefnis, leirinnihald og kornastærð og sýrustig eru mismunandi. Hún er í þremur aðferðarþrepum:

Aðferðarþrep 1: forrannsókn til að ákvarða:

— hlutfall jarðvegs og lausnar,

— jafnvægistíma fyrir ásogið og magn prófunarefnis sem hefur ásogast þegar jafnvægi er náð,

— ásog prófunarefnisins á yfirborði prófunaríláta og stöðugleiki prófunarefnisins á prófunartímanum.

Aðferðarþrep 2: skimunarprófun: ásogið er rannsakað í fimm mismunandi jarðvegsgerðum með hraðafræði ásogs með einum styrk og ákvörðun á dreifistuðlunum K_d og K_{oc}.

Aðferðarþrep 3: ákvörðun á ásogsferlum Freundlichs við fast hitastig til að ákvarða hvaða áhrif styrkur hefur á umfang ásogs í jarðvegi.

Rannsókn á afsogi með hraðafræði afsogs og afsogsferlum Freundlichs við fast hitastig (1. viðbætir).

1.3. SKILGREININGAR OG EININGAR

Tákn	Skilgreining	Einingar
A_{ti}	hundraðshluti ásogs á tímapunktinum t_i	%
A_{eq}	hundraðshluti ásogs við ásogsjafnvægi	%
$m_s^{ads}{}_{ti}$	massi prófunarefnis sem hefur ásogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i	µg
$m_s^{ads}\Delta_{ti}$	massi prófunarefnis sem hefur ásogast í jarðvegi á tímabilinu Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	massi prófunarefnis sem hefur ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi	µg
m_0	massi prófunarefnis í tilraunaglasinu við upphaf ásogsprófunarinnar	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	massi prófunarefnis mældur í deiliskammti (v_a^A) á tímapunktinum t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	massi efnisins í lausninni við ásogsjafnvægi	µg
m_{soil}	magn jarðvegsfasans, gefið upp sem þurrmassi jarðvegs	g
C_{st}	massastyrkur stofnlausnar efnisins	µg cm^{-3}
C_0	upphafsmassastyrkur prófunarlausnar sem er í snertingu við jarðveginn	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	massastyrkur efnisins í vatnsfasanum á tímapunktinum t_i þegar greiningin er gerð	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	innihald efnis sem hefur ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	massastyrkur efnisins í vatnsfasanum við ásogsjafnvægi	µg cm^{-3}
V_0	upphafsrúmmál vatnsfasans sem er í snertingu við jarðveg í ásogsprófuninni	cm^3
v_a^A	rúmmál deiliskammtsins sem prófunarefnið er mælt í	cm^3
K_d	dreifistuðull fyrir ásog	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	jafnaður ásogsstuðull fyrir lífrænt kolefni	cm^3 g^{-1}
K_{om}	jafnaður dreifistuðull fyrir lífrænt efni	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	ásogsstuðull Freundlichs	µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
1/n	veldisvísir Freundlichs	
D_{ti}	hundraðshluti afsogs á tímapunktinum t_i	%
$D_{\Delta ti}$	hundraðshluti afsogs sem svarar til tímabilsins Δt_i	%
K_{des}	stuðull sýndarafsogs	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	afsogsstuðull Freundlichs	µg $^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	massi prófunarefnis sem hefur afsogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	massi prófunarefnis sem hefur afsogast í jarðvegi á tímabilinu Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	massi efnisins sem er ákvarðaður með greiningu í vatnsfasanum við afsogsjafnvægi	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	heildarmassi prófunarefnis sem hefur afsogast við afsogsjafnvægi	µg

Tákn	Skilgreining	Einingar
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	massi efnisins sem helst ásogaður í jarðveginum eftir tímabilið Δt_i	µg
m_{aq}^{A}	massi efnis sem verður eftir við ásogsjafnvægi vegna ófullkominna rúmmálsskipta	µg
$C_s^{des}(eq)$	innihald prófunarefnis sem helst ásogað í jarðvegi við afsogsjafnvægi	µg g^{-1}
$C_{aq}^{des}(eq)$	massastyrkur prófunarefnisins í vatnsfasanum við afsogsjafnvægi	µg cm^{-3}
V_T	heildarrúmmál vatnsfasans sem er í snertingu við jarðveginn í tilraun fyrir hraðafræði afsogs sem er gerð með raðbundinni aðferð,	cm^3
V_R	rúmmál flotsins sem er tekið úr tilraunaglasinu eftir að ásogsjafnvægi hefur náðst og bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn	cm^3
V_a^D	rúmmál deiliskammts sem er tekinn til efnagreiningar frá tímabilinu (i) í tilraun fyrir hraðafræði afsogs sem er gerð með raðbundinni aðferð	cm^3
V_r^r	rúmmál lausnar sem tekin er úr tilraunaglasi (i) til að mæla prófunarefnið í tilraun fyrir hraðafræði afsogs (samhliða tilraun)	cm^3
V_r^F	rúmmál lausnar sem er tekin úr tilraunaglasinu til að mæla prófunarefnið við afsogsjafnvægi	cm^3
MB	massajöfnuður	%
m_E	heildarmassi prófunarefnis sem er dreginn úr jarðvegi og af hliðum prófunarílátsins í tveimur þrepum	µg
V_{rec}	rúmmál flotsins sem er endurheimt eftir ásogsjafnvægi	cm^3
P_{ow}	deilistuðull oktanóls/vatns	
pKa	klofnunarstuðull	
S_w	vatnsleysni	g l^{-1}

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Þekkt rúmmál lausna með prófunarefninu, ómerktu eða geislamerktu, með þekktum styrk í 0,01 M $CaCl_2$ er bætt við jarðvegssýni með þekktri þurrvigt sem hafa verið forjafnvægisstillt í 0,01 M $CaCl_2$. Blandan er hrist hæfilega lengi. Jarðvegslausnin er síðan skilin í skilvindu og, ef þess er óskað, síuð og vatnsfasinn er efnagreindur. Magn prófunarefnis, sem hefur ásogast í jarðvegssýninu, er reiknað sem mismunurinn á magni prófunarefnis, sem var upphaflega í lausninni, og því magni sem er eftir við lok tilraunarinnar (óbein aðferð).

Annar kostur er að ákvarða magn ásogaðs prófunarefnis beint með greiningu jarðvegsins (bein aðferð). Mælt er með því að þessi aðferð, sem felur í sér þrepskiptan útdrátt úr jarðvegi með viðeigandi leysi, sé notuð í tilvikum þar sem ekki er unnt að ákvarða af nákvæmni mun á styrk efnisins í lausn. Dæmi um slík tilvik eru: prófunarefnið ásogast á yfirborð prófunaríláta, prófunarefnið er óstöðugt meðan tilraunin fer fram, ásogið er annaðhvort svo lítið að litlar styrkbreytingar verða í lausninni eða svo mikið að styrkurinn verður minni en svo að hann verði ákvarðaður með nákvæmni. Ef geislamerkt efni er notað má komast hjá útdrætti úr jarðvegi með greiningu jarðvegsfasans með brennslu og sindurtalningu í vökva. Sindurtalning í vökva er hins vegar ósérhæfð aðferð sem greinir ekki milli móðurefna og ummyndunarefna; hún skal því eingöngu notuð ef prófunaríðefnið er stöðugt í allri rannsókninni.

1.5. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Öll efnafræðileg prófefni skulu vera af greiningarhreinleika. Mælt er með því að notuð séu ómerkt prófunarefni með þekktri samsetningu og helst af a.m.k. 95 % hreinleika eða geislamerkt prófunarefni með þekktri samsetningu og hreinleika geislamerktra efna. Ef notuð eru snefilefni með skömmum helmingunartíma skal leiðrétta fyrir sundrun.

Áður en prófun er gerð á ásogi og afsogi skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

a) vatnsleysni (A.6),

b) gufuþrýstingur (A.4) og/eða fasti samkvæmt lögmáli Henrys,

c) niðurbrot án tilstillis lífvera: vatnsrof sem fall af sýrustigi (C.7),

d) deilistuðull (A.8),

e) auðlífbrjótanleiki (C.4) eða loftháð eða loftfirrð ummyndun í jarðvegi,

f) pKa fyrir jónanleg efni,

g) beint ljósrof í vatni (þ.e. gleypniróf fyrir ÚF/sýnilegt ljós í vatni, skammtanýtni) og ljóssundrun í jarðvegi.

1.6. NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Prófunin hentar fyrir íðefni þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar greiningaraðferðir. Stöðugleiki prófunarefnisins í allri prófuninni er mikilvægur mæliþáttur sem getur haft áhrif á áreiðanleika niðurstaðna, einkum þegar óbein aðferð er notuð. Það er því algert skilyrði að kanna stöðugleikann í forrannsókn; ef ummyndun kemur fram á þeim tíma sem prófunin stendur er mælt með því að meginrannsóknin sé gerð með greiningu bæði á jarðvegs- og vatnsfösum.

Vandi getur komið upp ef þessi prófun er gerð með prófunarefnum sem hafa litla leysni í vatni ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), svo og ef um er að ræða efni með hárri hleðslu, þar eð ekki er unnt að mæla styrkinn með greiningu í vatnsfasanum með nægilegri nákvæmni. Í þessum tilvikum er nauðsynlegt að gera frekari ráðstafanir. Leiðbeiningar til að bregðast við þessum vanda er að finna í viðkomandi liðum þessarar aðferðar.

Við prófun á rokgjörnum efnum skal þess gætt að ekki verði tap á þeim í rannsókninni.

1.7. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.7.1. **Búnaður og efnafræðileg prófefni**

Venjulegur rannsóknarstofubúnaður, einkum eftirfarandi:

a) Tilraunaglös eða ílát fyrir prófanirnar. Mikilvægt er að þessi tilraunaglös eða ílát:

— passi beint í skilvindubúnaðinn til að lágmarka skekkjur við meðhöndlun og flutning,

— séu úr hvarftregu efni þannig að ásog prófunarefnis á yfirborð þess verði sem minnst.

b) Hristari: veltihristari eða jafngildur búnaður; hristibúnaðurinn á að halda jarðveginum í sviflausn meðan hrist er.

c) Skilvinda: helst hraðskilvinda, t.d. með skiljunarkrafti > 3000 g, hitastýrð, sem getur fjarlægt agnir, sem eru yfir 0,2 μm í þvermál, úr vatnslausn. Lok skulu vera á ílátunum meðan þau eru hrist og við skiljun í skilvindunni til að forðast rokgirni og vatnstap; nota skal óvirkjuð lok, t.d. skrúfuð lok með teflonhúð, til að lágmarka ásog á þau.

d) Valkvætt: síunarbúnaður, dauðhreinsaðar, einnota síur með 0,2 μm opstærð. Síunarefnið skal valið af sérstakri kostgæfni svo að komast megi hjá því að nokkuð af prófunarefninu tapist með því; þegar um er að ræða torleysanleg prófunarefni er ekki mælt með lífrænu síunarefni.

e) Tækjabúnaður til greiningar sem hentar til að mæla styrk prófunaríðefnisins.

f) Hitaskápur fyrir rannsóknarstofur sem getur haldið hita frá 103 °C til 110 °C.

1.7.2. **Lýsing á eiginleikum og val á jarðvegi**

Lýsa skal eiginleikum jarðvegs út frá þremur mæliþáttum sem taldir eru vega þyngst að því er varðar ásogshæfni: lífrænu kolefni, leirinnihaldi og kornastærð og sýrustigi. Eins og fyrr var getið (sjá gildissvið) geta aðrir eðlisefnafræðilegir eiginleikar jarðvegs haft áhrif á ásog/afsog tiltekins efnis og taka skal tillit til þeirra í slíkum tilvikum.

Þær aðferðir, sem eru notaðar til að lýsa eiginleikum jarðvegs, skipta mjög miklu máli og geta haft umtalsverð áhrif á niðurstöðurnar. Af þessum sökum er mælt með því að sýrustig jarðvegs sé mælt í 0,01 M $CaCl_2$-lausn (þ.e. lausnin sem er notuð í prófun á ásogi/afsogi) í samræmi við samsvarandi ISO-aðferð ISO-10390-1). Einnig er mælt með því að aðrir eiginleikar jarðvegs, sem skipta máli í þessu sambandi, séu ákvarðaðir í samræmi við staðlaðar aðferðir (t.d. ISO „Handbook of Soil Analysis“); þannig má greina gögn um sog á grundvelli alþjóðlega samræmdra jarðvegsmæliþátta. Nokkrar leiðbeiningar um fyrirliggjandi staðalaðferðir við greiningu á jarðvegi og lýsingu á eiginleikum hans er að finna í heimildum (50.–52. heimild). Við kvörðun á prófunaraðferðum fyrir jarðveg er mælt með því að nota viðmiðunarjarðveg.

Leiðbeiningar um val á jarðvegi fyrir ásogs-/afsogstilraunir er að finna í í töflu 1. Jarðvegsgerðirnar sjö, sem valdar eru, finnast í tempruðum beltum jarðar. Þegar um er að ræða jónanleg prófunarefni skal velja jarðvegsgerðir sem spanna vítt sýrustigssvið þannig að unnt sé að meta ásog efnisins bæði í jónuðu og ójónuðu ástandi. Leiðbeiningar um hve margar mismunandi gerðir jarðvegs skuli notaðar á mismunandi stigum prófunarinnar er að finna í lið 1.9 „framkvæmd prófunarinnar“.

Kjósi menn að nota frekar aðrar jarðvegsgerðir skal eiginleikum þeirra lýst út frá sömu mæliþáttum og þær skulu vera jafnmargbreytilegar að eiginleikum og þær sem lýst er í töflu 1 og skiptir þá engu þótt þær standist ekki allar viðmiðanir fullkomlega.

Tafla 1:

Leiðbeiningar um val á jarðvegssýnum fyrir ásog og afsog

Jarðvegsgerð	Sýrustigsbil (í 0,01 M $CaCl_2$)	Innihald lífræns kolefnis (%)	Leirinnihald (%)	Kornastærð jarðvegs (1)
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	leir
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	leirmold
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	siltmold
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	mold
5	< 4,0–6,0 (2)	< 0,5–1,5 (2) (3)	< 10–15 (3)	myldinn sandur
6	> 7,0	< 0,5–1,0 (2) (3)	40–65	leirmold/leir
7	< 4,5	> 10	< 10	sandur/myldinn sandur

(1) Samkvæmt kerfi Matvæla- og landbúnaðarstofnunar Sameinuðu þjóðanna og bandarísku kerfi (85. heimild) (85).

(2) Gildi færibreytnanna skulu helst vera innan þess sviðs sem er tiltekið. Reynist hins vegar erfitt að finna jarðveg af viðeigandi gerð má una við gildi sem eru undir tilgreindu lágmarki.

(3) Fylgni milli lífræns innihalds og ásogs getur raskast ef um er að ræða jarðveg með minna en 0,3% lífrænt kolefni. Af þeim sökum er mælt með því að notaður sé jarðvegur sem inniheldur að lágmarki 0,3% lífrænt kolefni.

1.7.3. **Taka og geymsla jarðvegssýna**

1.7.3.1. Söfnun

Ekki er mælt með neinni sérstakri sýnatökuaðferð eða tækjum; sýnatökuaðferðin ræðst af tilgangi rannsóknarinnar (53.–58. heimild).

Eftirfarandi skal haft í huga:

a) Nákvæmar upplýsingar um sögu staðarins eru nauðsynlegar; þetta tekur m.a. til staðsetningar, gróðurþekju, meðhöndlunar með varnarefnum og/eða áburði, lífrænna hjálparefna eða mengunar fyrir slysni. Fylgja skal ráðleggingum í ISO-staðlinum um töku jarðvegssýna (ISO 10381-6) að því er varðar lýsingu á sýnatökustaðnum.

b) Skilgreina skal sýnatökustaðinn með alþverstæðri merkatorvörpun (UTM, *Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum*) eða hnattstöðu; þetta gæti gert það kleift að safna aftur tiltekinni jarðvegstegund í framtíðinni eða gæti komið að gagni við að skilgreina jarðveg samkvæmt mismunandi flokkunarkerfum sem eru notuð í mismunandi löndum. Þá skal aðeins taka úr efsta jarðvegslaginu, að hámarksdýpt sem nemur 20 cm. Það gildir sérstaklega um jarðvegsgerð nr. 7 að ef $O_h$lagið (e. *O_h horizon*) er hluti jarðvegsins skal taka það með í sýnatökunni.

Jarðvegssýnin skulu höfð í ílátum í flutningi og við hitaskilyrði sem tryggja að upphaflegir eiginleikar jarðvegsins breytist ekki umtalsvert.

1.7.3.2. Geymsla

Ákjósanlegast er að nota nýtekin jarðvegssýni af viðkomandi stað. Ef þessu verður ekki við komið er hægt að geyma jarðveginn loftþurrkaðan við umhverfishita. Ekki er mælt með tímamörkum varðandi geymslutíma en hafi jarðvegur verið geymdur lengur en í þrjú ár skal greina hann aftur fyrir notkun m.t.t. innihalds lífræns kolefnis, sýrustigs og plúsjónaskiptagetu.

1.7.3.3. Meðhöndlun og tilreiðsla jarðvegssýnanna fyrir prófun

Jarðvegurinn er loftþurrkaður við umhverfishita (helst á bilinu 20–25 °C). Jarðvegurinn skal aðgreindur með sem minnstu átaki þannig að upphafleg kornastærð hans breytist sem minnst. Jarðvegurinn er sigtaður að agnastærðinni ≤ 2 mm; fylgja skal ráðleggingum í ISO-staðlinum um töku jarðvegsýna (ISO 10381-6) að því er varðar sigtunina. Mælt er með því að jafnað sé vandlega þar eð það eykur samanburðarnákvæmni niðurstaðnanna. Rakainnihald hvers jarðvegssýnis er ákvarðað í þremur deiliskömmtum með hitun að 105 °C þar til engin marktæk breyting verður á þyngd (u.þ.b. 12 klst.). Í öllum útreikningum vísar jarðvegsmassi til þurrmassa úr hitaskáp, þ.e. þyngdar jarðvegs sem hefur verið leiðrétt með tilliti til rakainnihalds.

1.7.4. **Tilreiðsla prófunarefnis sem á að bæta í jarðveg**

Prófunarefnið er leyst upp í 0,01 M $CaCl_2$-lausn í eimuðu eða afjónuðu vatni; $CaCl_2$-lausnin er notuð sem vatnskenndur leysisfasi til að auðvelda skiljun í skilvindu og halda plúsjónaskiptum í lágmarki. Styrkur stofnlausnarinnar skal helst vera þremur tugaþrepum meiri en greiningarmörk greiningaraðferðarinnar sem er notuð. Þessi viðmiðunarmörk tryggja nákvæmni mælinga að því er varðar þá aðferð sem er notuð í þessari aðferð; þar að auki skal styrkur stofnlausnarinnar vera undir vatnsleysni prófunarefnisins.

Æskilegast er að tilreiða stofnlausnina rétt áður en henni er bætt í jarðvegssýnin og hana skal geyma í lokuðu íláti í myrkri við 4 °C. Geymslutíminn ræðst af stöðugleika prófunarefnisins og styrk þess í lausninni.

Nauðsynlegt getur reynst, einungis að því er varðar torleysanleg efni ($Sw < 10^{-4}$ g l^{-1}), að nota viðeigandi uppleysandi efni þegar erfitt er að leysa prófunarefnið upp. Þetta uppleysandi efni: a) skal vera blandanlegt með vatni, t.d. metanól eða asetónítríl; b) skal ekki vera í styrk sem er yfir 1% af heildarrúmmáli stofnlausnarinnar og skal vera minna en sem því nemur í þeirri lausn prófunarefnisins sem kemst í snertingu við jarðveginn (helst innan við 0,1%) og c); skal ekki vera yfirborðsvirkt efni eða hvarfast við prófunaríðefnið. Notkun uppleysandi efnis skal tilgreind og rökstudd í skýrslu varðandi gögn.

Annar kostur, að því er varðar torleysanleg efni, er íbæting prófunarefnisins í prófunarkerfið: prófunarefnið er leyst upp í lífrænum leysi, deiliskammti af þessari lausn er bætt í kerfi jarðvegs og 0,01 M $CaCl_2$-lausnar í eimuðu eða afjónuðu vatni. Innihaldi lífræna leysisins í vatnsfasanum skal haldið í algeru lágmarki, að jafnaði ekki yfir 0,1%. Íbæting með lífrænni lausn getur haft í för með sér að samanburðarnákvæmni, að því er varðar rúmmál, skerðist. Aðrar skekkjur geta því komið fram þar eð styrkur prófunarefnisins og meðleysisins er ekki sá sami í öllum prófunum.

1.8. FORSENDUR FYRIR FRAMKVÆMD PRÓFUNAR Á ÁSOGI/AFSOGI

1.8.1. **Greiningaraðferð**

Lykilmæliþættir, sem geta haft áhrif á nákvæmni mælinga á sogi, eru m.a. nákvæmni greiningaraðferða við greiningu bæði á lausnar- og ásogsfasa, stöðugleiki og hreinleiki prófunarefnisins, það hvort sogjafnvægi næst, umfang styrkbreytinga í lausninni, hlutfall jarðvegs og lausnar og breytingar á byggingu jarðvegs í jafnvægisferlinu (35. og 59–62. heimild). Í 2. viðbæti er að finna nokkur dæmi sem lúta að nákvæmni.

Kanna ber áreiðanleika greiningaraðferðarinnar, sem er notuð, við það styrkleikabil sem líklegt er að komi fram í prófuninni. Rannsakandanum er frjálst að þróa heppilega aðferð með viðeigandi nákvæmni, samkvæmni, samanburðarnákvæmni, greiningarmörkum og endurheimt. Hér á eftir eru gefnar leiðbeiningar um hvernig skuli framkvæma tilraun af þessu tagi.

Hæfilegt magn af 0,01 M $CaCl_2$-lausn, t.d. 100 cm^3, er hrist í 4 klst. saman við jarðveg af tiltekinni þyngd, t.d. 20 g, sem hefur mikla ásogshæfni, þ.e. sem inniheldur mikið af lífrænu kolefni og leir; þyngd og rúmmál geta breyst eftir því sem greiningar kalla á en hlutfall jarðvegs/lausnar upp á 1:5 er heppilegt til að byrja með. Blandan er skilin í skilvindu og vatnsfasinn síaður ef vill. Tilteknu rúmmáli af stofnlausn prófunarefnisins er bætt við það síðarnefnda til að ná þeim nafnstyrk innan styrkleikabilsins sem líklegt er að komi fram í prófuninni. Þetta rúmmál skal ekki fara yfir 10% af lokarúmmáli vatnsfasans svo að sem minnstar breytingar verði á eðli lausnarinnar áður en hún nær jafnvægi. Lausnin er efnagreind.

Ein blanksýnisprófun með kerfinu jarðvegur + $CaCl_2$-lausn (án prófunarefnis) skal gerð í því skyni að kanna truflanir (e. *artefact*) í greiningaraðferðinni og áhrif frá efniviði jarðvegsins.

Þær greiningaraðferðir, sem hægt er að nota til mælinga á sogi, eru m.a. gasvökvagreining (GLC), háþrýstivökvaskiljun (HPLC), litrófsgreining (t.d. GC/massagreining, háþrýstivökvaskiljun/massagreining) og sindurtalning í vökva (þegar um er að ræða geislamerkt efni). Greiningaraðferð, sem er notuð, telst heppileg, án tillits hver hún er, ef heimtur eru á bilinu 90–110% af nafngildi. Svo að unnt sé að koma við greiningu og mati eftir að skipting hefur átt sér stað skulu greiningarmörk greiningaraðferðarinnar vera a.m.k. tveimur tugaþrepum undir nafnstyrknum.

Eiginleikar og greiningarmörk greiningaraðferðar, sem er fyrirliggjandi til að framkvæma ásogsrannsóknir, gegna mikilvægu hlutverki við ákvörðun á prófunarskilyrðum og allri framkvæmd prófunarinnar. Í þessari aðferð er almennri framkvæmd tilrauna fylgt og henni fylgja ráð og leiðbeiningar um aðrar lausnir ef greiningaraðferðin og aðstaða á rannsóknarstofunni setja einhverjar takmarkanir.

1.8.2. **Val á heppilegasta hlutfalli jarðvegs og lausnar**

Val á heppilegu hlutfalli jarðvegs og lausnar til rannsókna á sogi ræðst af dreifistuðlinum K_d og því umfangi hlutfallslegs ásogs sem óskað er. Breyting á styrk efnisins í lausninni ákvarðar tölfræðilega nákvæmni mælingarinnar, sem byggist á formi ásogsjöfnunnar og takmörkum greiningaraðferðarinnar, við greiningu á styrk íðefnis í lausn. Í venjubundnum rannsóknum er því gagnlegt að koma sér niður á nokkur föst hlutföll þar sem hundraðshlutinn, sem ásogast, er yfir 20% og helst > 50% (62. heimild) en þess skal þó gætt að styrkur prófunarefnisins í vatnsfasanum sé nógu mikill til að unnt sé að mæla hann með nákvæmni. Þetta er sérstaklega brýnt ef hundraðshluti ásogs er stór.

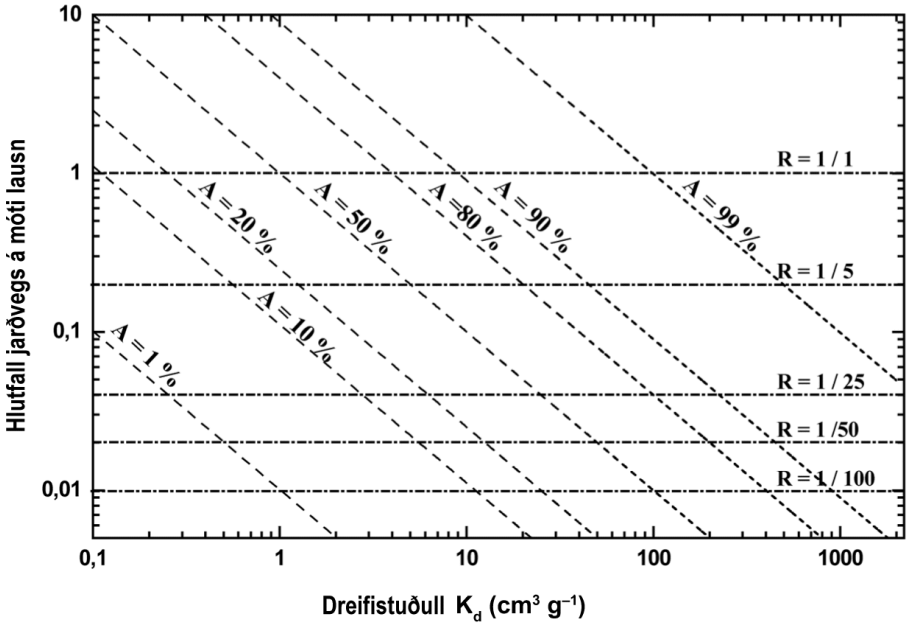
Heppileg aðferð til að velja viðeigandi hlutfall jarðvegs og vatns byggist á mati á gildi K_d, annaðhvort með forrannsóknum eða með viðteknum matsaðferðum (3. viðbætir). Val á viðeigandi hlutfalli má síðan byggja á línuriti af hlutfalli jarðvegs og lausnar á móti K_d fyrir fastan hundraðshluta ásogs (mynd 1). Í þessu línuriti er gert ráð fyrir því að ásogsjafnan sé línuleg ([1]). Venslin fást með því að umraða jöfnu (4) fyrir K_d þannig að hún verði á sama formi og jafna (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

eða á lograformi sínu þar sem gert er ráð fyrir því að R = m_{soil}/V_0 og A_{eq} %/100 = $\frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)}\right] \quad (2)$$



Mynd 1 Vensl milli hlutfalls jarðvegs og lausnar og K_d við mismunandi hundraðshluta ásogaðs prófunarefnis

Mynd 1 sýnir hlutfall jarðvegs og lausnar sem fall af K_d fyrir mismikið ásog. Sem dæmi má nefna að ef hlutfall jarðvegs og lausnar er 1:5 og K_d er 20 verður ásogið u.þ.b. 80%. Til að fá 50% ásog við sama K_d verður að nota hlutfallið 1:25. Þessi aðferð við að velja viðeigandi hlutfall jarðvegs og lausnar veitir rannsakandanum það svigrúm sem hann þarf við framkvæmd tilraunarinnar.

Erfiðast er að fást við þau tilvik þar sem íðefnið ásogast annaðhvort mjög mikið eða mjög lítið. Ef ásogið verður mjög lítið er mælt með því að hlutfall jarðvegs og lausnar sé 1:1 en ef um er að ræða tilteknar gerðir jarðvegs með miklu, lífrænu efni getur hlutfallið þurft að vera lægra til þess að fá fram grugglausn. Gæta verður varkárni í tengslum við greiningaraðferðina þegar mældar eru litlar breytingar á styrk lausnar; að öðrum kosti er hætt við að ásogsmælingarnar verði ónákvæmar. Ef dreifistuðullinn K_d er á hinn bóginn mjög hár getur hlutfall jarðvegs og lausnar verið allt að 1:100 þannig að eftir verði umtalsvert magn íðefnisins í lausninni. Hins vegar verður að sjá til þess að blöndun takist vel og gefa verður kerfinu nægan tíma til að ná jafnvægi. Önnur aðferð til að fást við þessi öfgatilvik, þar sem ekki liggja fyrir fullnægjandi greiningaraðferðir, er að spá fyrir um gildið á K_d með því að beita matsaðferðum sem byggjast t.d. á gildum P_{ow} (3. viðbætir). Þetta gæti reynst gagnlegt, einkum þegar um er að ræða íðefni, sem ásogast lítið eða eru lítt skautuð og með $P_{ow} < 20$, eða íðefni sem eru fitusækin og mjög sogandi og með $P_{ow} > 10^4$.

1.9. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.9.1. **Prófunarskilyrði**

Allar tilraunir eru gerðar við umhverfishita og, ef unnt er, við stöðugan hita á bilinu 20 °C til 25 °C.

Skilyrði við skiljun í skilvindu skulu vera þannig að unnt sé að fjarlægja úr lausninni agnir sem eru stærri en 0,2 µm. Þetta gildi svarar til smæstu agnanna sem litið er á sem fastar agnir og þar liggja mörkin milli fastra agna og svifagna. Í 4. viðbæti er að finna leiðbeiningar um hvernig eigi að ákvarða skilyrði við skiljun í skilvindu.

Ef skilvindubúnaðurinn einn nægir ekki til þess að unnt sé að fjarlægja agnir sem eru stærri en 0,2 µm má tvinna saman notkun skilvindu og síu með 0,2 µm opstærð. Síurnar skulu vera úr nægilega hvarftregu efni þannig að ekkert prófunarefni tapist með þeim. Í öllu falli skal það staðfest að ekkert tap verði á prófunarefninu við síun.

1.9.2. **Aðferðarþrep 1 — Forrannsókn**

Tilganginum með því að framkvæma forrannsókn hefur þegar verið lýst í hlutanum um gildissvið. Leiðbeiningar um uppsetningu slíkrar prófunar eru gefnar með tilrauninni sem lögð er til hér á eftir.

1.9.2.1. *Val á heppilegasta hlutfalli jarðvegs og lausnar*

Notaðar eru tvær jarðvegsgerðir og þrenns konar hlutfall jarðvegs og lausnar (sex tilraunir). Önnur jarðvegsgerðanna inniheldur mikið, lífrænt kolefni en lítinn leir og hin inniheldur lítið, lífrænt kolefni en mikinn leir. Tillaga er gerð um eftirfarandi hlutfall jarðvegs og lausnar:

— 50 g jarðvegs og 50 cm^3 vatnslausn með prófunarefninu (hlutfallið 1/1),

— 10 g jarðvegs og 50 cm^3 vatnslausn með prófunarefninu (hlutfallið 1/5),

— 2 g jarðvegs og 50 cm^3 vatnslausn með prófunarefninu (hlutfallið 1/25).

Minnsta magn jarðvegs, sem komast má af með í tilrauninni, ræðst af búnaði á rannsóknarstofunni og nothæfi þeirra greiningaraðferða sem eru notaðar. Þó er mælt með því að nota a.m.k. 1 g og helst 2 g til að fá áreiðanlegar niðurstöður úr prófuninni.

Eitt samanburðarsýni, eingöngu með prófunarefninu í 0,01 M $CaCl_2$-lausn (engum jarðvegi), er látið fara gegnum nákvæmlega sömu þrep og prófunarkerfin til að kanna stöðugleika prófunarefnisins í $CaCl_2$-lausn og hugsanlegt ásog þess á yfirborð prófunarílátanna.

Fyrir hverja jarðvegsgerð er gerð blanksýnisprófun í sama prófunarferli með sama magni af jarðvegi og heildarrúmmálinu 50 cm^3 af 0,01 M $CaCl_2$-lausn (án prófunarefnis). Þetta gegnir hlutverki bakgrunns-samanburðar í greiningunni til að greina truflandi efni eða mengun í jarðvegi.

Allar tilraunirnar, þ.m.t. þær með samanburðar- og blanksýnum, skulu gerðar a.m.k. tvisvar. Reikna má heildarfjölda sýna, sem skal útbúa fyrir rannsóknina, út frá þeirri aðferð sem verður notuð.

Að jafnaði er sama aðferð notuð bæði við forrannsóknina og meginrannsóknina nema annað sé tekið fram.

Loftþurrkuð jarðvegssýni eru látin ná jafnvægi með því að hrista þau aðfaranótt (12 klst.) tilraunardagsins með lágmarksrúmmáli sem nemur 45 cm^3 af 0,01 M $CaCl_2$-lausn. Síðan er tilteknu rúmmáli af stofnlausninni með prófunarefninu bætt við til að láta endanlegt rúmmál vera 50 cm^3. Rúmmál viðbættrar stofnlausnar: a) skal ekki fara yfir 10% af endanlegu 50 cm^3 rúmmáli vatnsfasans til að sem minnst breyting verði á eðli lausnarinnar áður en jafnvægi næst; og b) skal helst leiða til þess að upphafsstyrkur prófunarefnisins, sem kemst í snertingu við jarðveginn (C_0), verði a.m.k. tveimur tugaþrepum yfir greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar; þessi viðmiðunarmörk tryggja að unnt sé að framkvæma nákvæmar mælingar jafnvel þótt ásog verði mikið (> 90%) og að ákvarða síðar ásogsferla við fast hitastig. Einnig er mælt með því, ef unnt er, að upphafsstyrkur efnisins (C_0) verði ekki meiri en sem nemur helmingi af leysnimörkum þess.

Hér á eftir er gefið dæmi um það hvernig styrkur stofnlausnarinnar (C_{st}) er reiknaður. Gert er ráð fyrir greiningarmörkunum 0,01 μg cm^{-3} og 90% ásogi; upphafsstyrkur prófunarefnisins, sem kemst í snertingu við jarðveginn, skal því helst vera 1 μg cm^{-3} (tveimur tugaþrepum yfir greiningarmarkinu). Ef gert er ráð fyrir því að ráðlögðu hámarksrúmmáli stofnlausnar sé bætt við, þ.e. 5 til 45 cm^3 af 0,01 M $CaCl_2$-jafnvægislausn (= 10% af stofnlausninni í heildarrúmmálið 50 cm^3 af vatnsfasanum), ætti styrkur stofnlausnarinnar að vera 10 μg cm^{-3}; þetta er þremur tugaþrepum yfir greiningarmörkum greiningaraðferðarinnar.

Sýrustig vatnsfasans skal mælt á undan og eftir að hann kemst í snertingu við jarðveginn þar eð það gegnir mikilvægu hlutverki í öllu ásogsferlinu, einkum þegar um er að ræða jónanleg efni.

Blandan er hrist þar til ásogsjafnvægi hefur náðst. Jafnvægistíminn fyrir jarðveg er mjög breytilegur og ræðst af íðefninu og jarðveginum; að jafnaði eru 24 klst. nægilegur tími (77. heimild). Í forrannsókninni má taka sýnin í röð á því 48 klst. tímabili sem blöndun stendur yfir (t.d. eftir 4, 8, 24 og 48 klst.). Tímapunktar, þegar greiningar fara fram, skulu þó valdir með sveigjanleika og miðast við verkferli rannsóknarstofunnar.

Tveir valkostir eru fyrir greiningu á prófunarefninu í vatnslausn: a) samhliða aðferð og b) raðbundin aðferð. Leggja skal áherslu á að þótt samhliða aðferðin sé seinlegri í framkvæmd en hin aðferðin er stærðfræðileg úrvinnsla niðurstaðna úr henni einfaldari (5. viðbætir). Það skal þó vera rannsakandinn sem velur þá aðferð sem notuð er því að hann þarf að vega og meta fyrirliggjandi búnað og tilföng á rannsóknarstofunni.

a) Samhliða aðferð: sýni með sama hlutfalli jarðvegs og lausnar eru útbúin, jafnmörg tímabilunum þar sem æskilegt þykir að rannsaka hraðafræði ásogs. Að lokinni skiljun í skilvindu og, ef þess er óskað, síun skal vatnsfasinn í fyrsta tilraunaglasinu endurheimtur svo fullkomlega sem unnt er og hann skal mældur eftir t.d. 4 klst., fasinn úr öðru glasinu eftir 8 klst., fasinn úr því þriðja eftir 24 klst. o.s.frv.

b) Raðbundin aðferð: fyrir hvert hlutfall jarðvegs og lausnar er einungis útbúið tvöfalt sýni. Blandan er skilin í skilvindu með tilteknu millibili til að aðskilja fasana. Lítill deiliskammtur af vatnsfasanum er efnagreindur þegar í stað m.t.t. prófunarefnisins; síðan er tilrauninni haldið áfram með upphaflegu blöndunni. Ef síun fer fram að lokinni skiljun í skilvindu skal vera búnaður í rannsóknarstofunni til að sía litla deiliskammta af vatnsfasanum. Mælt er með því að heildarrúmmál teknu deiliskammtanna sé ekki meira en 1% af heildarrúmmáli lausnarinnar þannig að hlutfall jarðvegs og lausnar breytist ekki umtalsvert eða að massi uppleysta efnisins, sem er tiltækur til ásogs í prófuninni, minnki ekki að marki.

Hundraðshluti ásogs At_i er reiknaður á hverjum tímapunkti (t_i) á grundvelli upphaflegs nafnstyrks og mælds styrks á sýnatökutímanum (t_i), með leiðréttingu fyrir gildið á blanksýninu.

Línurit er teiknað fyrir At_i á móti tíma (mynd 1 í 5. viðbæti) til að meta að hversu miklu leyti jafnvægi hefur náðst (18. heimild) ([1]). Gildi K_d við jafnvægi er einnig reiknað. Út frá þessu gildi K_d er viðeigandi hlutfall jarðvegs og lausnar valið af mynd 1 þannig að hundraðshluti ásogs verði yfir 20% og helst > 50% (61. heimild). Í liðnum gögn og skýrslugjöf og í 5. viðbæti er að finna allar viðeigandi jöfnur og meginreglur um teikningu línurita.

1.9.2.2. *Ákvörðun á jafnvægistíma ásogs og magni ásogaðs prófunarefnis við jafnvægi*

Eins og áður var getið er unnt að meta út frá línuriti, þar sem At_i eða C_{aq}^{ads} er teiknað sem fall á móti tíma, hvort ásogsjafnvægi næst og einnig magn ásogaðs prófunarefnis við jafnvægi. Myndir 1 og 2 í 5. viðbæti sýna dæmi um slík línurit. Jafnvægistíminn er sá tími sem það tekur kerfið að ná jafnvægi.

Ef stöðug aukning kemur fram fyrir tiltekinn jarðveg og jafnvægi næst ekki getur skýringarinnar verið að leita í truflandi þáttum á borð við lífrænt niðurbrot eða hægt flæði. Staðfesta má lífrænt niðurbrot með því að endurtaka tilraunina með dauðhreinsuðu sýni af jarðveginum. Náist jafnvægi ekki einu sinni í þessu tilviki skal rannsakandinn leita annarra fyrirbæra sem hugsanlegt er að hafi áhrif á þessar rannsóknir hans; þetta er unnt með því að breyta prófunarskilyrðunum á viðeigandi hátt (hitastigi, hristitíma eða hlutfalli jarðvegs og lausnar). Það er rannsakandans að ákveða hvort halda skuli prófun áfram þrátt fyrir að hugsanlega takist ekki að ná jafnvægi.

1.9.2.3. *Ásog prófunarefnis á yfirborð prófunarílátsins og stöðugleiki efnisins*

Með greiningu á samanburðarsýnunum er hægt að leiða út einhverjar upplýsingar um ásog prófunarefnisins á yfirborð prófunarláta, svo og um stöðugleika þess. Ef skerðingin, sem kemur fram, er meiri en sem nemur staðalskekkju greiningaraðferðarinnar er hugsanlegt að niðurbrot án tilstillis lífvera og/eða ásog á yfirborð prófunarílátsins sé skýringin. Hugsanlega má greina milli þessara tveggja fyrirbæra með því að skola hliðar ílátsins vandlega með þekktu rúmmáli heppilegs leysis og efnagreina skollausnina m.t.t. prófunarefnisins. Ef ekki er um neitt ásog að ræða á yfirborði prófunarílátsins sýnir skerðingin fram á óstöðugleika prófunarefnisins sem er án tilstillis lífvera. Ef ásog er staðfest er nauðsynlegt að velja prófunarílát úr öðru efni. Gögn úr þessari tilraun fyrir ásog á yfirborð prófunarláta er á hinn bóginn ekki hægt að framreikna beint yfir á tilraun fyrir jarðveg og lausn. Jarðvegurinn hefur áhrif á þetta ásog.

([1]) Línurit fyrir styrk prófunarefnis í vatnsfasanum $\left(C_{aq}^{ads}\right)$ sem fall af tíma getur einnig nýst til að meta hvort stöðugt jafnvægi náist (sjá 2. mynd í 5. viðbæti).

Frekari upplýsingar um stöðugleika prófunarefnisins er hægt að leiða út með því að ákvarða upprunalegan massajöfnuð yfir tíma. Þetta merkir að vatnsfasinn, útdráttur úr jarðvegi og hliðar ílátsins eru efnagreind m.t.t. prófunarefnisins. Munurinn á massa viðbætts prófunaríðefnis og massasummu prófunaríðefnisins í vatnsfasanum, útdrætti úr jarðveginum og af hliðum prófunarílátsins er jafn massa efnis sem brotnar niður og/eða gufar upp og/eða er ekki dreginn út. Við ákvörðun á massajöfnuði skal ásogsjafnvægi nást áður en tilrauninni lýkur.

Massajöfnuður er ákvarðaður fyrir bæði jarðvegssýnin og fyrir eitt hlutfall jarðvegs og lausnar fyrir hverja jarðvegsgerð sem við jafnvægi sýnir skerðingu yfir 20% og helst > 50%. Þegar tilrauninni, þar sem hlutfall milli jarðvegs og lausnar er fundið, er lokið með greiningu á síðasta vatnsfasasýninu eftir 48 klst. eru fasarnir aðskildir í skilvindu og, ef þess er óskað, með síun. Vatnsfasinn er endurheimtur eins og frekast er unnt og heppilegum útdráttarleysi (útdráttarstuðull skal a.m.k. vera 95%) bætt við jarðveginn til að draga út prófunarefnið. Mælt er með því að dregið sé út tvisvar í röð. Magn prófunarefnis í útdrættinum úr jarðveginum og úr prófunarílátinu er ákvarðað og massajöfnuðinn reiknaður (jafna 10, gögn og skýrslugjöf). Ef hann er undir 90% telst prófunarefnið óstöðugt meðan prófunin fer fram. Rannsóknum má þó halda áfram og taka þá tillit til óstöðugleika prófunarefnisins; í þessu tilviki er mælt með því að báðir fasarnir verði efnagreindir í meginrannsókninni.

1.9.3. Aðferðarþrep 2 — Hraðafræði ásogs við einn styrkleika prófunarefnisins

Fimm jarðvegsgerðir eru notaðar, valdar úr töflu 1. Heppilegt er að sumar eða allar jarðvegsgerðirnar, sem voru notaðar í forrannsóknunum, séu meðal þessar fimm jarðvegsgerða, ef við á. Í því tilviki þarf ekki að endurtaka aðferðarþrep 2 fyrir þær jarðvegsgerðir sem voru notaðar í forrannsókninni.

Jafnvægistími, hlutfall jarðvegs og lausnar, þyngd jarðvegssýnisins, rúmmál vatnsfasans, sem kemst í snertingu við jarðveginn og styrkur prófunarefnisins í lausninni eru valin út frá niðurstöðum úr forrannsókninni. Greiningar skulu helst gerðar að liðnum u.þ.b. 2, 4, 6, 8 (hugsanlega líka 10) og 24 klst. snertingartíma; hristitímann má lengja að hámarki í 48 klst. þegar um er að ræða íðefni sem útheimtir lengri jafnvægistíma m.t.t. til niðurstaðna úr rannsóknum á hlutfalli jarðvegs og lausnar. Ef þörf krefur má þó laga greiningartímana að aðstæðum.

Hver tilraun (ein jarðvegsgerð og ein lausn) er gerð a.m.k. tvisvar sinnum til að unnt sé að meta dreifni niðurstaðnanna. Eitt blanksýni er notað í hverri tilraun. Það inniheldur jarðveg og 0,01 M $CaCl_2$-lausn, án prófunarefnis, og þyngd og rúmmál jarðvegs og lausnar eru eins og í tilrauninni sjálfri. Samanburðarsýni, sem er eingöngu með prófunarefninu í 0,01 M $CaCl_2$-lausn (án jarðvegs), er meðhöndlað með sömu prófunaraðferð og er hugsað sem leið til að bregðast við óvæntum þáttum.

Hundraðshluti ásogs er reiknaður á hverjum tímapunkti

A_{ti} og/eða tímabilinu

Δ_{ti} (eftir þörfum) og er teiknaður á móti tíma. Dreifistuðullinn K_d við jafnvægi er einnig reiknaður, svo og jafnaður ásogsstuðull fyrir lífrænt kolefni K_{oc} (fyrir óskautuð, lífræn íðefni).

Niðurstöður úr prófun á hraðafræði ásogs

Gildi fyrir línulegt K_d er að jafnaði nákvæm lýsing á soghegðun í jarðvegi (35. og 78. heimild) og tjáir eðlislægan hreyfanleika íðefna í jarðvegi. Til dæmis eru íðefni með $K_d < 1$ cm^3 g^{-1} að jafnaði talin eigindlega hreyfanleg. MacCall o.fl. hafa enn fremur þróað flokkunarkerfi fyrir hreyfanleika sem byggist á K_{oc} gildum (16. heimild). Auk þess eru til flokkunarkerfi fyrir útskolun sem byggjast á venslum milli K_{oc} og DT-50 ([1]) (19., 32. og 79. heimild).

Samkvæmt skekkjugreiningarrannsóknum (61. heimild) er heldur ekki unnt að meta K_d-gildi, sem eru undir 0,3 cm^3 g^{-1}, nákvæmlega út frá minnkun styrks í vatnsfasanum, jafnvel við hagstæðasta (út frá nákvæmni) hlutfall jarðvegs og lausnar, þ.e. 1:1. Í slíku tilviki er mælt með því að báðir fasar, jarðvegur og lausn, séu greindir.

Í ljósi þess sem fram kemur hér að framan er mælt með því að rannsóknum á ásogshegðun íðefnis í jarðvegi og hugsanlegum hreyfanleika þess verði haldið áfram með því að ákvarða ásogsferla Freundlichs við fast hitastig fyrir þessi kerfi þar sem unnt er að ákvarða K_d nákvæmlega með þeirri aðferðarlýsingu tilraunar sem fylgt er í þessari prófunaraðferð. Nákvæm ákvörðun er gerleg svo fremi margfeldi K_d með hlutfalli jarðvegs og lausnar gefi gildi > 0,3, þegar mælingar byggjast á minnkun styrks í vatnsfasanum (óbein aðferð), eða > 0,1 þegar báðir fasarnir eru efnagreindir (bein aðferð) (61. heimild).

([1]) DT-50: niðurbrotstími fyrir 50% prófunarefnisins.

1.9.4. *Aðferðarþrep 3 — Ásogsferlar við fast hitastig og hraðafræði afsogs/afsogsferlar við fast hitastig*

1.9.4.1. Ásogsferlar við fast hitastig

Notaðir eru fimm styrkleikar prófunarefnisins, helst þannig að þeir spanni tvö tugaþrep; við val á þessum styrkleikum skal taka tillit til vatnsleysninnar og tilheyrandi jafnvægisstyrks í vatnsfasanum. Sama hlutfall jarðvegs og lausnar skal notað fyrir hverja jarðvegsgerð í allri rannsókninni. Ásogsprófunin er gerð eins og lýst er hér að framan með því eina fráviki að vatnsfasinn er efnagreindur aðeins einu sinni, á þeim tíma sem þarf til að ná jafnvægi, eins og áður var ákvarðað í aðferðarþrepi 2 Jafnvægisstyrkleikar lausnarinnar eru ákvarðaðir og ásogað magn er reiknað út frá skerðingu prófunarefnisins í lausninni eða með beinu aðferðinni. Ásogaður massi fyrir hverja massaeiningu jarðvegs er teiknaður sem fall af jafnvægisstyrk prófunarefnisins (sjá gögn og skýrslugjöf).

Niðurstöður úr tilraun fyrir ásogsferla við fast hitastig

Af þeim reiknilíkönum sem hafa verið sett fram fyrir ásog fram að þessu er ásogsferill Freundlichs við fast hitastig oftast notaður til að lýsa ásogsferlum. Ítarlegri upplýsingar um túlkun ásogslíkana og mikilvægi þeirra má finna í 41., 45., 80., 81. og 82. heimild.

Athugasemd: Það skal nefnt að samanburður á gildum K_F (ásogsstuðli Freundlichs) fyrir mismunandi efni er því aðeins gerlegur að þessi gildi fyrir K_F séu gefin upp í sömu einingum (83. heimild).

1.9.4.2. Hraðafræði afsogs

Markmiðið með þessari tilraun er að rannsaka hvort ásog íðefnis í jarðvegi er afturkræft eða ekki. Þessar upplýsingar eru mikilvægar þar eð afsogsferlið gegnir einnig mikilvægu hlutverki í hegðun íðefnis í jarðvegi á landbúnaðarlandi. Gögn um afsog eru enn fremur gagnleg inntaksgögn við gerð tölvulíkans sem hermir eftir útskolun og afrennsli uppleystra efna. Ef óskað er eftir afsogsrannsókn er mælt með því að rannsóknin, sem er lýst hér á eftir, sé gerð fyrir hvort kerfi þar sem koma mátti við nákvæmri ákvörðun á K_d í undanfarandi tilraun á hraðafræði ásogs.

Líkt og í rannsókninni á hraðafræði ásogs er um tvær aðferðir að velja við tilraun fyrir hraðafræði afsogs: a) samhliða aðferð og b) raðbundna aðferð. Það skal vera rannsakandinn sem velur þá aðferð sem notuð er því að hann þarf að vega og meta fyrirliggjandi búnað og tilföng á rannsóknarstofunni.

a) Samhliða aðferð: sýni með sama hlutfalli jarðvegs og lausnar eru útbúin fyrir hverja jarðvegsgerð sem er valin til að halda afsogsrannsókninni áfram, jafnmörg tímabilunum þar sem æskilegt þykir að rannsaka hraðafræði afsogs. Helst skulu tímabilin vera hin sömu og í tilrauninni með hraðafræði ásogs; heildartímann má þó lengja eftir þörfum þannig að kerfið nái afsogsjafnvægi. Í hverri tilraun (ein jarðvegsgerð, ein lausn) er notað eitt blanksýni. Það inniheldur jarðveg og 0,01 M $CaCl_2$-lausn, án prófunarefnis, og þyngd og rúmmál jarðvegs og lausnar eru eins og í tilrauninni sjálfri. Prófunarefni í 0,01 M $CaCl_2$lausn (án jarðvegs) er meðhöndlað sem samanburðarsýni með sömu prófunaraðferð. Allar blöndur jarðvegs og lausnar eru hristar þar til ásogsjafnvægi næst (eins og ákveðið var áður í aðferðarþrepi 2). Síðan eru fasarnir aðskildir í skilvindu og vatnsfasarnir fjarlægðir eins og frekast er unnt. Í stað þess rúmmáls lausnar sem er fjarlægt er sett sama rúmmál af 0,01 M $CaCl_2$ án prófunarefnis og nýju blöndurnar eru hristar á ný. Vatnsfasinn úr fyrsta tilraunaglasinu er endurheimtur svo fullkomlega sem unnt er og mældur eftir t.d. 2 klst., sá úr öðru glasinu eftir 4 klst., sá úr því þriðja eftir 6 klst. o.s.frv. þar til afsogsjafnvægi hefur náðst.

b) Raðbundin aðferð: að lokinni tilraun fyrir hraðafræði ásogs er blandan sett í skilvindu og vatnsfasinn fjarlægður eins og frekast er unnt. Í stað þess rúmmáls lausnar sem er fjarlægt er sett sama rúmmál af 0,01 M $CaCl_2$ án prófunarefnisins. Nýja blandan er hrist þar til afsogsjafnvægi hefur náðst. Á þessu tímabili er blandan skilin í skilvindu með tilteknu millibili til að aðskilja fasana. Lítill deiliskammtur af vatnsfasanum er greindur þegar í stað m.t.t. prófunarefnisins; síðan er tilrauninni haldið áfram með upphaflegu blöndunni. Rúmmál hvers einstaks deiliskammts skal vera innan við 1% af heildarrúmmálinu. Sama magni af ferskri 0,01 M $CaCl_2$-lausn er bætt við blönduna í því skyni að halda óbreyttu hlutfalli jarðvegs og lausnar og hrist áfram þar til kemur að næsta tímabili.

Hundraðshluti afsogs er reiknaður á hverjum tímapunkti (D_{ti}) og/eða tímabilinu Δ_{ti} (eftir því sem rannsóknin útheimtir) og er teiknaður á móti tíma. Afsogsstuðullinn K_{des} við jafnvægi er einnig reiknaður. Allar viðeigandi jöfnur er að finna í gögn og skýrslugjöf og í 5. viðbæti.

Niðurstöður úr tilraun fyrir hraðafræði afsogs

Sameiginlegt línurit af hundraðshluta afsogs D_{ti} og afsogs At_i á móti tíma gera það kleift að meta hvort ásogsferillinn gengur til baka. Ásogið telst geta gengið til baka ef afsogsjafnvægi næst á minna en tvöföldum þeim tíma sem það tekur að ná ásogsjafnvægi og ef heildarafsogið er meira en 75% af magni þess sem ásogast.

1.9.4.3. Afsogsferlar við fast hitastig

Afsogsferlar Freundlichs við fast hitastig eru ákvarðaðir fyrir þær jarðvegsgerðir sem eru notaðar í tilraun fyrir ásogsferla við fast hitastig. Afsogsprófunin er gerð eins og lýst er í liðnum „hraðafræði afsogs“, með því eina fráviki að vatnsfasinn er efnagreindur aðeins einu sinni, við afsogsjafnvægi. Magn prófunarefnis, sem afsogast, er reiknað. Innihald prófunarefnis, sem helst ásogað í jarðveginum við afsogsjafnvægi, er teiknað sem fall af jafnvægisstyrk prófunarefnisins í lausn (sjá gögn og skýrslugjöf og 5. viðbæti).

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

Greiningargögn eru sett fram í töfluformi (sjá 6. viðbæti). Einstakar mælingar og reiknuð meðaltöl eru tilgreind. Ásogsferlar við fast hitastig eru settir fram í myndrænni útfærslu. Útreikningar eru gerðir eins og lýst er hér á eftir.

Í þessari prófun er gengið út frá því að þyngd 1 cm^3 af vatnslausn sé 1 g. Hlutfall jarðvegs og lausnar má gefa upp í einingunum þyngdarhlutfall eða þyngd/rúmmál með sama tölugildi.

2.1. ÁSOG

Ásog (At_i) er skilgreint sem hundraðshluti þess efnis sem ásogast í jarðveginum við prófunarskilyrðin miðað við magn efnisins í upphafi prófunarinnar.

Ef prófunarefnið er stöðugt og ásogast ekki að marki á hliðar ílátsins

er A_{ti} reiknað út á hverjum tímapunkti t_i samkvæmt jöfnunni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

þar sem:

A_{ti} = hundraðshluti ásogs á tímapunktinum t_i (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = massi prófunarefnis sem hefur ásogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i (µg),

m_0 = massi prófunarefnis í tilraunaglasinu við upphaf prófunarinnar (µg).

Ítarlegar upplýsingar um það hvernig reikna skuli hundraðshluta ásogs At_i í samhliða og raðbundnu aðferðunum eru gefnar í 5. viðbæti.

Dreifistuðullinn K_d er hlutfallið milli innihalds efnisins í jarðvegsfasanum og massastyrks efnisins í vatnsfasanum, við prófunarskilyrðin, þegar ásogsjafnvægi hefur náðst.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

þar sem:

$C_s^{ads}(eq)$ = magn efnis sem ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi (µg g^{-1})

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massastyrkur efnisins í vatnsfasanum við ásogsjafnvægi (µg cm^{-3}). Þessi styrkur er ákvarðaður með greiningu, að teknu tilliti til gildanna sem blanksýnin gefa.

$m_s^{ads}(eq)$ = massi efnis sem ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi (µg),
$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massi efnis í lausn við ásogsjafnvægi (µg),
m_{soil} = magn jarðvegsfasans, gefið upp sem þurrmassi jarðvegs (g)
V_0 = upphafsrúmmál vatnsfasans sem er í snertingu við jarðveg (cm^3).

Venslin milli A_{eq} og K_d eru gefin með jöfnunni:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (5)$$

þar sem:

A_{eq} = hundraðshluti ásogs við ásogsjafnvægi, %.

Jafnaður ásogsstuðull K_{oc} fyrir lífrænt kolefni tengir dreifistuðulinn K_d við innihald lífræns kolefnis í jarðvegssýninu:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

þar sem:

%OC = hundraðshluti lífræns kolefnis í jarðvegssýninu (g g^{-1}).

Stuðullinn K_{oc} táknar stakt gildi sem einkennir skiptingu, einkum óskautaðra, lífrænna íðefna milli lífræns kolefnis í jarðvegi eða seti og vatni. Fylgni er á milli ásogs þessara íðefna og lífræns innihalds í fasta efninu sem sogar (7. heimild); gildið á K_{oc} ræðst þess vegna af sérstökum eiginleikum myldisþáttanna (e. *humic fractions*) sem eru talsvert mismunandi að því er varðar soghæfni vegna mismunandi uppruna, tilurðar o.s.frv.

2.1.1. **Ásogsferlar við fast hitastig**

Jafnan fyrir ásogsferla Freundlichs við fast hitastig tengir magn prófunarefnis, sem ásogast, við styrk prófunarefnisins í lausn við jafnvægi (jafna 8).

Unnið er úr gögnunum eins og lýst er í „ásog“ og reiknað, fyrir hvert tilraunaglas, magn prófunarefnis sem ásogast í jarðveginum eftir ásogsprófunina ($C_s^{ads}(eq)$, annars staðar táknað sem x/m). Gert er ráð fyrir því að jafnvægi hafi náðst og að $C_s^{ads}(eq)$ tákni jafnvægisgildið:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Jöfnuna fyrir ásog Freundlichs er að finna í (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

eða á línulegu formi:

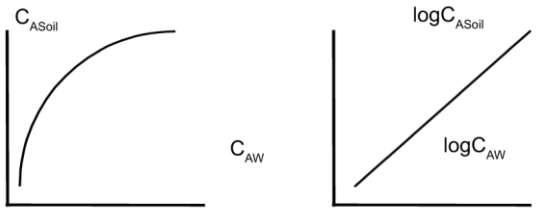
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

þar sem:

K_F^{ads} = ásogsstuðull Freundlichs; stærð hans er $cm^3\ g^{-1}$ því aðeins að 1/n = 1; í öllum öðrum tilvikum er hallinn 1/n tekinn með í stærð K_F^{ads} ($\mu g^{1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}\ g^{-1}$),

n = aðhvarfsstuðull; l/n er að jafnaði á bilinu 0,7–1,0 sem gefur til kynna að gögn um sog séu iðulega lítillega ólínuleg.

Teiknuð eru línurit eftir jöfnum 8 og 9 og gildin fyrir K_F^{ads} og 1/n eru reiknuð með aðhvarfsgreiningu með því að nota jöfnu 9. Fylgnistuðullinn r^2 fyrir lograjöfnuna er einnig reiknaður. Dæmi um línurit af þessu tagi eru sýnd á mynd 2.



Mynd 2 Línurit fyrir ásogsferil Freundlichs, jafnað og línugert

2.1.2. **Massajöfnuður**

Massajöfnuður (MB) er skilgreint sem hundraðshluti þess efnis, sem hægt er að endurheimta í efnagreiningu eftir ásogsprófun, á móti nafnmagni efnis í upphafi prófunarinnar.

Vinnsla gagna verður önnur ef leysirinn er fullkomlega blandanlegur með vatni. Ef um er að ræða vatnsblandanlegan leysi er hægt að ákvarða magn efnis sem endurheimtist með leysisútdrætti með því að vinna gögnin á sama hátt og lýst er undir „afsog“. Ef leysirinn blandast vatni ekki fullkomlega verður að ákvarða magnið sem endurheimtist.

Massajöfnuður (MB) fyrir ásog er reiknaður á eftirfarandi hátt; gert er ráð fyrir því að hugtakið (mE) svari til summu massa prófunaríðefnisins sem er dreginn úr jarðvegi og af yfirborði prófunarílátsins með lífrænum leysi:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

þar sem:

MB = massajöfnuður (%),
m_E = heildarmassi prófunarefnis sem er dreginn úr jarðvegi og af hliðum prófunarílátsins í tveimur þrepum (µg),
C_0 = upphafsmassastyrkur prófunarlausnar sem er í snertingu við jarðveginn (µg cm^{-3})
V_{rec} = rúmmál þess flots sem er endurheimt eftir ásogsjafnvægið (cm^{-3}).

2.2. AFSOG

Afsog (D) er skilgreint sem hundraðshluti þess prófunarefnis sem afsogast miðað við magn efnis sem hefur áður afsogast við prófunarskilyrði:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} 100(\%) \qquad (11)$$

þar sem:

D_{ti} = hundraðshluti afsogs á tímapunktinum t_i(%),

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = massi prófunarefnis sem afsogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i (µg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massi prófunarefnis sem ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi (µg).

Ítarlegar upplýsingar um það hvernig reikna skuli hundraðshluta afsogs D_{ti} í samhliða og raðbundnu aðferðunum eru gefnar í 5. viðbæti.

Stuðullinn fyrir sýndarafsog (K_{des}) er, við prófunarskilyrðin, hlutfallið milli magns efnisins, sem er eftir í jarðvegsfasanum, og massastyrks afsogaða efnisins í vatnsfasanum þegar afsogsjafnvægi hefur náðst:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

þar sem:

K_{des} = afsogsstuðull ($cm^3\ g^{-1}$),
$m_{aq}^{des}(eq)$ = heildarmassi prófunarefnis sem afsogast í jarðvegi við afsogsjafnvægi (µg),
V_T = heildarrúmmál vatnsfasans sem er í snertingu við jarðveg í prófuninni fyrir hraðafræði afsogs (cm^3).

Leiðbeiningar til að reikna $m_{aq}^{des}(eq)$ er að finna í 5. viðbæti undir fyrirsögninni „afsog“.

Athugasemd

Hafi ásogsprófunin, sem var gerð á undan, verið gerð með samhliða aðferð er gert ráð fyrir að rúmmálið V_T í jöfnu 12 sé jafnt og V_0.

2.2.1. **Afsogsferlar við fast hitastig**

Jafnan fyrir afsogsferla Freundlichs við fast hitastig tengir magn prófunarefnis, sem helst ásogað í jarðveginum, við styrk prófunarefnisins í lausn við afsogsjafnvægi (jafna 16).

Magn þess efnis, sem helst ásogað í jarðvegi við afsogsjafnvægi, er reiknað fyrir hvert tilraunaglas á eftirfarandi hátt:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ er skilgreint sem:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^{A}(\mu g) \quad (14)$$

þar sem:

$C_s^{des}(eq)$ = magn þess prófunarefnis sem helst ásogað í jarðveginum við afsogsjafnvægi (µg g^{-1}),
$m_m^{des}(eq)$ = massi efnisins sem er ákvarðaður með greiningu í vatnsfasanum við afsogsjafnvægi (µg),
m_{aq}^{A} = massi prófunarefnis sem verður eftir við ásogsjafnvægi vegna ófullkominna rúmmálsskipta (µg),
$m_{aq}^{des}(eq)$ = massi efnis í lausn við ásogsjafnvægi (µg),

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = rúmmál lausnar sem er tekin úr tilraunaglasinu til að mæla prófunarefnið við afsogsjafnvægi (cm^3),
V_R = rúmmál flotsins sem er tekið úr tilraunaglasinu eftir að ásogsjafnvægi hefur náðst og bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn (cm^3),

Jöfnuna fyrir afsog Freundlichs er að finna í (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

eða á línulegu formi:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \qquad (17)$$

þar sem:

K_F^{des} = afsogsstuðull Freundlichs,

n = aðhvarfsstuðull,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = massastyrkur efnisins í vatnsfasanum við afsogsjafnvægi (µg cm^{-3}).

Teikna má línurit eftir jöfnum 16 og 17 og gildin fyrir K_F^{des} og 1/n eru reiknuð með aðhvarfsgreiningu með því að nota jöfnu 17.

Athugasemd:

Ef ásogs- eða afsogsveldisvísir Freundlichs, 1/n, er jafn 1 verða ásogs- eða afsogsbindifastar Freundlichs (K_F^{ads} og K_F^{des}) jafnir ásogs- eða afsogsjafnvægisföstunum (K_d og K_{des}) eftir því sem við á og ferlar fyrir C_s á móti C_{aq} verða línulegir. Séu veldisvísarnir ekki jafnir 1 verður ferillinn fyrir C_s á móti C_{aq} ekki línulegur og ásogs- og afsogsfastarnir breytast eftir jafnhitaferlunum.

2.2.2. **Prófunarskýrsla**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

— Fullkomin auðkenning á þeim jarðvegssýnum, sem eru notuð, þ.m.t.:

— landfræðileg viðmiðun fyrir staðinn (breiddar- og lengdargráða),

— dagsetning sýnatöku,

— notkunarmynstur (t.d. nytjajarðvegur, skógur o.s.frv.),

— dýpt sýnatöku,

— sand-/silt-/leirinnihald,

— sýrustig (í 0,01 M $CaCl_2$),

— innihald lífræns kolefnis,

— innihald lífræns efnis,

— innihald köfnunarefnis,

— hlutfall C/N,

— plúsjónaskiptageta (mmól/kg),

— allar upplýsingar um söfnun og geymslu jarðvegssýna,

— allar upplýsingar til að túlka ásog/afsog prófunarefnisins, eftir því sem við á,

— tilvísun til aðferða sem eru notaðar við ákvörðun hvers mæliþáttar,

— upplýsingar um prófunarefnið eins og við á,

— hitastig í tilraununum,

— skilyrði við skiljun í skilvindu,

— greiningarferli sem er notað til að greina prófunarefnið,

— rökstuðningur fyrir hvers kyns notkun uppleysandi efnis við tilreiðslu stofnlausnar með prófunarefninu,

— útskýringar á leiðréttingum í útreikningum, ef við á,

— gögn samkvæmt eyðublaði (6. viðbætir) og myndrænum framsetningum,

— allar upplýsingar og athugasemdir sem eru gagnlegar við túlkun niðurstaðna úr prófununum.

3. **HEIMILDIR**

1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987) Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.

3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, 0PPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

11) BBA (1990) Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

12) Calvet R., (1989) "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

13) Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, bls. 83-122.

14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication No 22, bls. 31-44.

15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974) "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), bls. 29-35.

16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H.J., (1981) "Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis", in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965) "Movement and sorption of chemicals applied to the soil". Weeds, 13, bls. 185-190.

18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) "Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils". J.Agric.Food Chem., 18, bls. 524-528.

19) Russell M.H., (1995), "Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil" in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.B., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988) "Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides", IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, bls. 901-932.

21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976) "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, bls. 137-157, BCPC, Surrey, UK.

22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967) "Persistence of herbicides in soil". J. Sci. Food Agric., 18, bls. 269-273.

23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981) "Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-1,3, 5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption". Pestic. Sci. 12, bls. 45-52.

24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977) "Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides". Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, bls. 961-971.

25) Osgerby J.M., (1973) "Process affecting herbicide action in soil". Pestic. Sci., 4, bls. 247-258.

26) Guth J.A., (1972) "Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden". Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, bls. 143-154.

27) Hamaker J.W., (1975) "The interpretation of soil leaching experiments", in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), bls. 135-172, Plenum Press, NY.

28) Helling C.S., (1971) "Pesticide mobility in soils". Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, bls. 732-210.

29) Hamaker J.W., (1972) "Diffusion and volatilization" in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, bls. 49-143.

30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981) "Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system". Pestic. Sci. 12, bls. 37-44.

31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984) "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, bls. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

32) Gustafson D.I., (1989) "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), bls. 339-357.

33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976) "Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils". J. of Soil Sci., 28, bls. 340-350.

34) Bromilov R.H., and Leistra M., (1980) "Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils". Pest. Sci., 11, bls. 389-395.

35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990) "Sorption estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series No 2, bls. 80-101,

36) Lambert S.M., (1967) "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, bls. 572-576.

37) Hance R.J., (1969) "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, bls. 667-668.

38) Briggs G.G. (1969) "Molecular structure of herbicides and their sorption by soils". Nature, 223, bls. 1288.

39) Briggs G.G. (1981) "Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor". J. Agric. Food Chem., 29, bls. 1050-1059.

40) Sabljic A., (1984) "Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology". J. Agric. Food Chem., 32, bls. 243-246.

41) Bailey G.W., and White J.L., (1970) "Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil". Residue Rev., 32, bls. 29-92.

42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg., (1968) "Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate". Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32, bls. 222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere 10, bls. 833-846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989) "Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners". Environ. Toxicol. Safety 21, bls. 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M., (1972) "Adsorption in organic chemicals" in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, bls. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971 "Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils". Weed Sci. 19, bls. 67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M. and Santelmann, (1975) "Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils". Weed Science, Vol. 23, bls. 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) "Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations" in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, bls. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980) "Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase", CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982) 11th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. "Methods of Soil Analysis", Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) "Precision in pesticide adsorption measurements". Soil Sci. Am. Proc., 34, 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970) "Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine". Soil Sci., bls. 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system". Pest. Sci. 1990, 30, bls. 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. "Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106" Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C., (1980) "Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique". Weed Res. 21, bls. 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981) "Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments". J. Environ.Qual., 10(3), bls. 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983) "Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water". Environ. Sci. Technol., 17(4), bls. 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984) "Sorption of organic substances by soils and sediments". J. Environm. Sci. Health, B19 (3), bls. 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), "Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons". Chemosphere, 16(1), bls. 109-116.

(68) Lyman W.J. , Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990) Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980) "Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota" in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), bls. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979) "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". Science, Vol. 206, bls. 831-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981) "Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption". Soil Sci. Soc. Am. J. 45, bls. 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), "Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils". Chemosphere, Vol. 10(8), bls. 833-846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981) "Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité — reactivité. Revue de l'Agric., 34 (4), bls. 319-322.

(74) Müller M., Kördel W. (1996) "Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil". Chemosphere, 32(12), bls. 2493-2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995) "HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test". Chemosphere 30 (7), bls. 1373-1384.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases. Chemosphere 27 (12), bls. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), "The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides". Weed Research, Vol. 7, bls. 29-36.

(78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, bls. 297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970) "Interpretation and use of sorption isotherms" in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, bls. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960) "Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils". J. Chem. Soc., bls. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J.C., (1980) "Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption". Ann. Agron. 31, bls. 239-251.

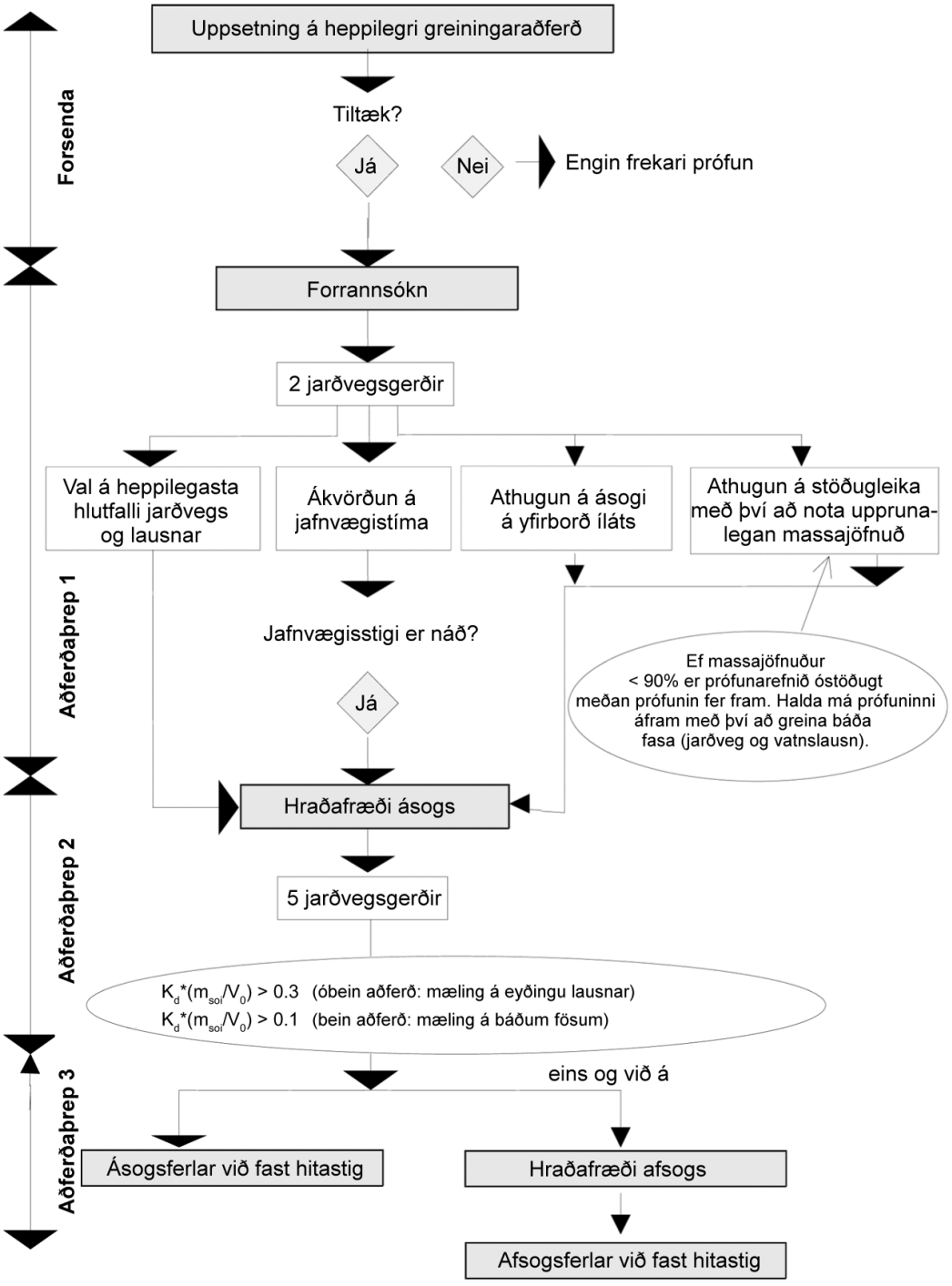
(83) Bedbur E., (1996) "Anomalies in the Freundlich equation", Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, U.K.

(84) Guth, J.A., (1985) "Adsorption/desorption", in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, bls. 305 (1962).

1. viðbætir

Prófunaráætlun



2. viðbætir

NÁKVÆMNI GREININGARAÐFERÐAR OG STYRKLEIKABREYTINGA OG ÁHRIF ÞEIRRA Á NÁKVÆMNI ÁSOGSNIÐURSTAÐNA

Af eftirfarandi töflu (84) má ráða að þegar munurinn á upphafsmassa (m_0 = 110 µg) og jafnvægismassa (m_s^{ads}(eq) = 100 µg) prófunarefnisins í lausninni er mjög lítill leiðir skekkja, sem nemur 5% í mælingu á jafnvægisstyrk, til skekkju, sem nemur 50%, í útreikningi á massa þess efnis sem ásogast í jarðvegi (m_s^{ads} (eq)) og til skekkju sem nemur 52,4% í útreikningum á K_d.

Magn jarðvegs m_{soil} = 10 g

Rúmmál lausnar V_0 = 100 cm^3

	m_{aq}^{ads}(eq) (µg)	C_{aq}^{ads}(eq) (µg cm^{-3})	R	m_s^{ads}(eq)* (µg)	C_s^{ads}(eq)* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
m_0 = 110 µg eða C_0 = 1,100 µg/cm^3	**FYRIR A = 9%**							
	100	1,000	sanngildi	10	1,00	sanngildi	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
m_0= 110 µg eða C_0 = 1,100 µg/cm^3	**FYRIR A = 55%**							
	50,0	0,500	sanngildi	60,0	6,00	sanngildi	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
m_0 = 110 µg eða C_0 = 1,100 µg/cm^3	**FYRIR A = 99%**							
	1,100	0,011	sanngildi	108,9	10,89	sanngildi	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}} .\ Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)}\frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = massi prófunarefnisins í jarðvegsfasanum við jafnvægi, µg,

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massi prófunarefnisins í vatnsfasanum við jafnvægi, µg,

$C_s^{ads}(eq)$ = innihald prófunarefnisins í jarðvegsfasanum við jafnvægi, µg g^{-1},

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = massastyrkur prófunarefnisins í vatnsfasanum við jafnvægi, µg cm^{-3},

R = greiningarskekkja við ákvörðun m_{aq}^{ads}(eq),

R‡ = reiknuð skekkja sem stafar af greiningarskekkjunni R.

3. viðbætir

AÐFERÐIR TIL AÐ META K_D

1. Matsaðferðir gera kleift að spá fyrir um gildi K_d á grundvelli fylgni við t.d. gildi á P_{ow} (12., 39. og 63.–68. heimild), við gögn um vatnsleysni (12., 19., 21., 39. og 68.–73. heimild) eða við gögn um skautun sem eru leidd út með því að beita háþrýstivökvaskiljun (HPLC) á óskautaðan stöðufasa (74.–76. heimild). Eins og sýnt er í töflu 1 og 2 reiknast K_{oc} eða K_{om} úr frá þessum jöfnum og síðan reiknast K_d óbeint út frá jöfnunum:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Hugmyndin um þessa fylgni er byggð á tveimur forsendum: 1) það er lífræna efnið í jarðveginum sem ræður mestu um ásog efnis; og 2) milliverkanirnar sem í hlut eiga eru að mestu ópólaðar. Af því leiðir að þessi fylgni: 1) gildir ekki, eða aðeins að litlu leyti, um skautuð efni og 2) gildir ekki í tilvikum þar sem jarðvegurinn inniheldur mjög lítið af lífrænu efni (12. heimild). Það sama verður hins vegar ekki fullyrt um venslin milli vatnsleysni og umfangs ásogs (19. og 21. heimild) þrátt fyrir að fullnægjandi fylgni hafi verið staðfest milli P_{ow} og ásogs (19. heimild); niðurstöður rannsókna hafa fram til þessa verið afar misvísandi.

3. Nokkur dæmi um fylgni milli ásogsstuðuls og deilistuðuls oktanóls-vatns sem og um vatnsleysni er að finna í töflu 1 og í töflu 2, eftir því sem við á.

Tafla 1

Dæmi um fylgni milli dreifistuðuls ásogs og deilistuðuls oktanóls-vatns; frekari dæmi má finna í 12. og 68. heimild.

Efni	Fylgni	Höfundar
Setnar þvagefnissameindir	$\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39. heimild)
Klóraðir arómatar	$\log K_{oc} = -0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65. heimild)
Ýmis varnarefni	$\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66. heimild)
Arómatísk vetniskolefni	$\log K_{oc} = -253 + 115 \log P_{ow}$	Vowles og Mantoura (1987) (67. heimild)

Tafla 2

Dæmi um fylgni milli dreifistuðuls ásogs og vatnsleysni; frekari dæmi má finna í 68. og 69. heimild

Efnasambönd	Fylgni	Höfundar
Ýmis varnarefni	$\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$	Gerstl og Mingelgrin (1984) (66. heimild)
Alifatísk, arómatísk, klóruð efni	$\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70. heimild)
α-naftól	$\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71. heimild)
Hringuð, alifatísk, arómatísk efni	$\log K_{oc} = -1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72. heimild)
Ýmis efnasambönd	$\log K_{om} = 2{,}75 - 045 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73. heimild)

4. viðbætir

ÚTREIKNINGAR TIL AÐ ÁKVARÐA SKILYRÐI VIÐ SKILJUN Í SKILVINDU

1. Skiljunartíminn fæst með eftirfarandi formúlu; gert er ráð fyrir hnöttóttum ögnum:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2\left(\rho_s - \rho_{aq}\right)}\right] \ln\left(R_b/R_t\right) \qquad (1)$$

Til einföldunar eru allir mæliþættir gefnir upp í einingum sem eru utan SI-kerfisins (g, cm).

þar sem:

ω = snúningshraði (=2 π rpm/60), rad s^{-1}

rpm = snúningar á mínútu

η = seigja lausnar, g s^{-1} cm^{-1}

rp = radíus agna, cm

ρs = eðlisþyngd jarðvegs, g cm^{-3}

ρaq = eðlisþyngd lausnar, g cm^{-3}

Rt = fjarlægð frá miðjum snúði skilvindunnar til yfirborðs lausnar í skilvinduglasinu í cm

Rb = fjarlægð frá miðjum snúði skilvindunnar til botns skilvinduglassins í cm

Rb-Rt = hæð blöndu jarðvegs og lausnar í skilvinduglasinu, í cm.

Í reynd er yfirleitt notaður tvöfaldaður reiknaður tími til að tryggja algeran aðskilnað.

2. Einfalda má jöfnu 1 enn frekar ef gert er ráð fyrir því að seigja (η) og eðlismassi (ρ_{aq}) lausnarinnar sé jöfn seigju og eðlismassi vatns við 25 °C; þá verður $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm–1 og $\rho_{aq} = 1{,}0$ g, cm^{-3}.

Þá er skiljunartíminn fundinn með jöfnu 2:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2\left(\rho_s - 1\right)} \ln\frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

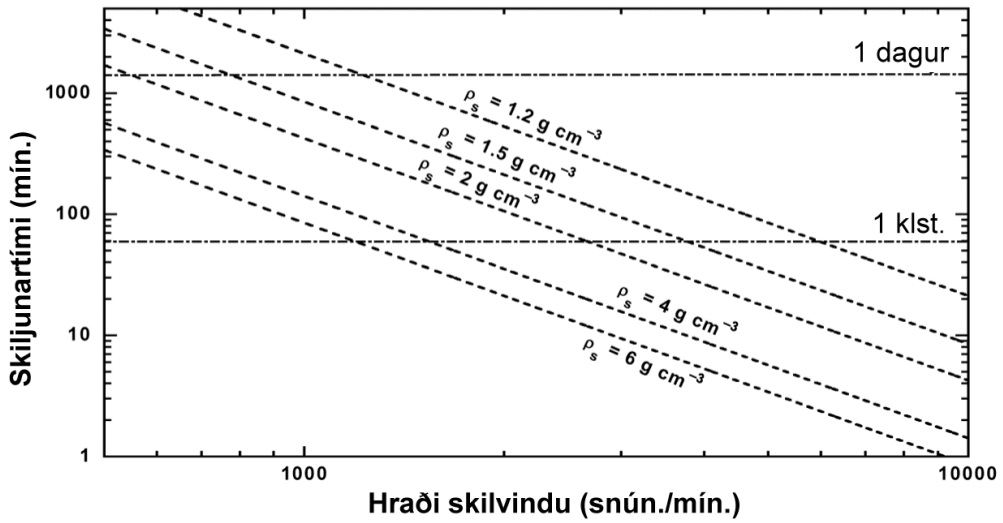
3. Af jöfnu 2 má ráða að tveir mæliþættir eru mikilvægir við ákvörðun á skilyrðum við skiljun, þ.e. tími (t) og hraði (rpm), þannig að náist að skilja frá agnir af tiltekinni stærð (í þessu tilviki með 0,1 μm radíus): 1) eðlismassi jarðvegs og 2) hæð blöndunnar í skilvinduglasinu (R_b–R_t), þ.e. vegalengdin sem jarðvegsögn ferðast frá yfirborði lausnarinnar til botns glassins; augljóst er að fyrir tiltekið rúmmál blöndunnar í glasinu ræðst hæð blöndunnar í glasinu af kvaðrati radíuss þess.

4. Mynd 1 sýnir breytingar á skiljunartímanum (t) á móti hraða skilvindunnar (rpm) fyrir jarðveg með mismunandi eðlisþyngdir (ρ_s) (mynd 1a) og fyrir mismunandi hæðir blöndunnar í skilvinduglösunum (mynd 2a). Mynd 1a leiðir greinilega í ljós áhrif eðlismassa jarðvegs; t.d. við hefðbundna skiljun við 3000 snúninga á mínútu er skiljunartíminn u.þ.b. 240 mín. þegar um er að ræða jarðveg með eðlismassann 1,2 g cm^{-3} en aðeins 50 mín. þegar eðlisþyngdin er 2,0 g cm–3. Af mynd 1b sést að á sama hátt, fyrir hefðbundna skiljun við 3000 snún./mín., er skiljunartíminn u.þ.b. 50 mínútur fyrir blöndu sem er 10 cm á hæð og aðeins 7 mínútur fyrir 1 cm hæð. Hins vegar er mikilvægt að finna ákjósanleg tengsl milli skiljunar, sem krefst minnstu mögulegu hæðar og þess að auðvelt sé fyrir rannsakandann að aðskilja fasana eftir skiljun.

5. Þegar tilraunaskilyrði eru ákveðin við aðskilnað jarðvegs- og lausnarfasanna er enn fremur mikilvægt að vega og meta hugsanlega tilvist svifagna, þriðja „sýndarfasans“. Þessar agnir, sem eru minni en 0,2 μm, geta haft mikil áhrif á allt ásogsferli efnis í jarðvegssviflausn. Þegar skiljun er framkvæmd eins og lýst er hér að framan haldast svifagnir í vatnsfasanum og eru greindar ásamt vatnsfasanum. Af þeim sökum glatast upplýsingarnar um áhrif þeirra.

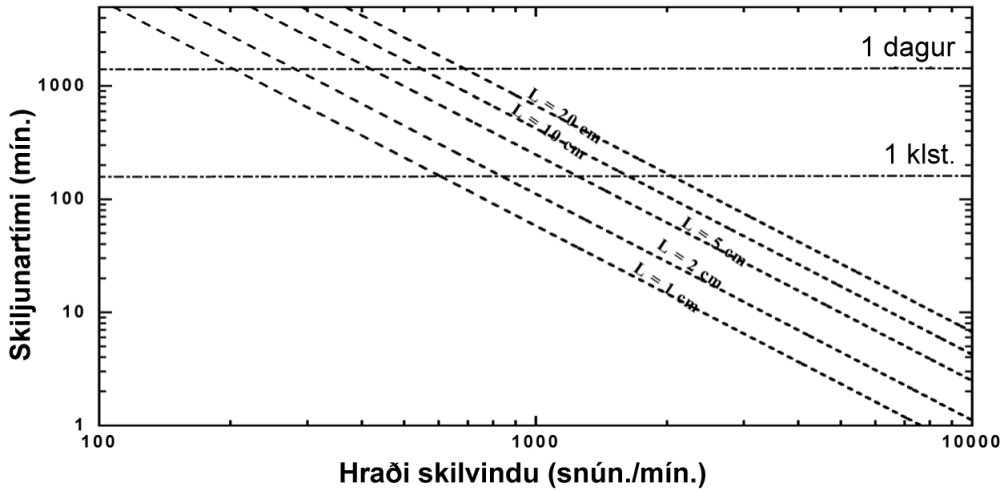
Ef búnaður til hraðskiljunar eða örsíunar er á rannsóknarstofunni, sem framkvæmir rannsóknina, er unnt að rannsaka ásog/afsog efnis í jarðvegi ítarlegar, þ.m.t. upplýsingar um ásog efnisins á svifagnir Í því tilviki skal nota hraðskiljun með 60 000 snúningum á mín. eða örsíun með síu, þar sem opstærðin er 100 000 dalton, í því skyni að aðskilja fasana þrjá: jarðveg, svifagnir og lausn. Einnig skal breyta aðferðarlýsingu prófunar til samræmis við þetta þannig að allir fasarnir þrír verði greindir m.t.t. efnis.

Mynd 1a.



Vensl milli skiljunartíma (t) og hraða skilvindu (rpm) við mismunandi eðlismassa jarðvegs (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b - R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1} og ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3} við 25 °C.

Mynd 1b.

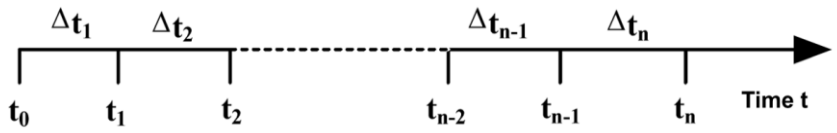


Vensl milli skiljunartíma (t) og hraða skilvindu (rpm) við mismunandi hæð blöndunnar í skilvinduglasinu (R_b - R_t) = L; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g. cm^{-3} við 25 °C og ρ_s = 2,0 g cm^{-3}.

5. viðbætir

ÚTREIKNINGAR Á ÁSOGI A (%) OG AFSOGI D (%)

Tímaáætlunin fyrir aðferðina er:



Við alla útreikninga er gert ráð fyrir því að prófunarefnið sé stöðugt og ásogist ekki að marki á hliðar ílátsins.

ÁSOG A (A%)

a) *Samhliða aðferð*

Hundraðshluti ásogs er reiknaður fyrir hvert tilraunaglas (i) við hvern tímapunkt (t_i) samkvæmt jöfnunni:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Liðina í þessari jöfnu má reikna á eftirfarandi hátt:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (3)$$

þar sem:

A_{t_i} = hundraðshluti (%) ásogs á tímapunktinum t_i

$m_s^{ads}(t_i)$ = massi prófunarefnisins í jarðvegi á tímapunktinum t_i þegar greiningin er gerð (µg)

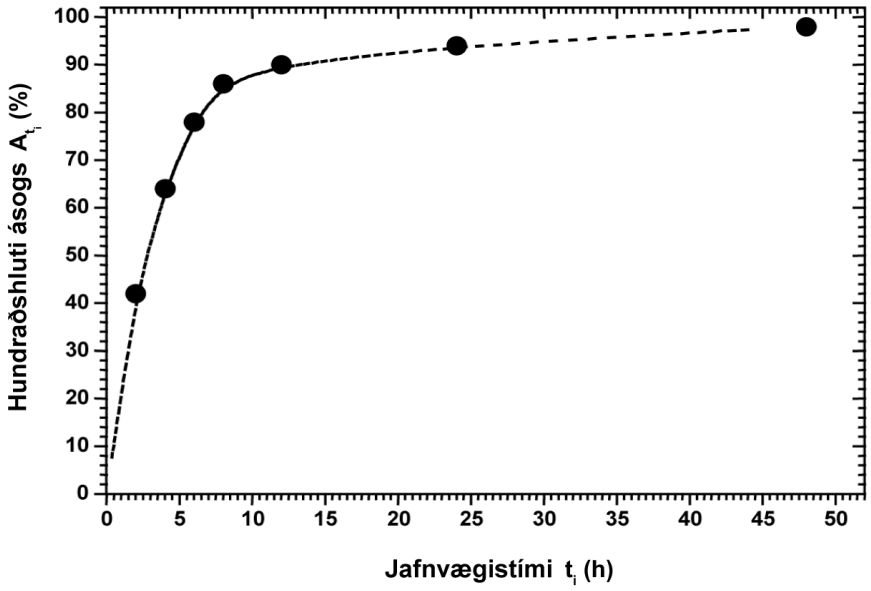
m_0 = massi prófunarefnis í tilraunaglasinu við upphaf prófunarinnar (µg)

C_0 = upphafsmassastyrkur prófunarlausnar sem er í snertingu við jarðveginn (µg cm^{-3})

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = massastyrkur efnisins í vatnsfasanum á tímapunktinum t_i þegar greiningin er gerð (µg cm^{-3}); þessi styrkur er ákvarðaður með greiningu, að teknu tilliti til gildanna sem blanksýnin gefa

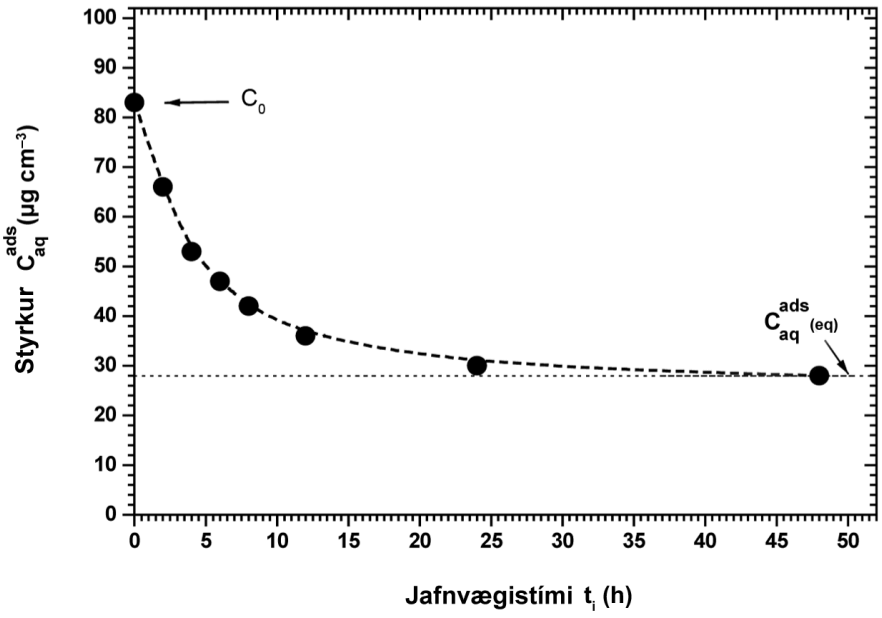
V_0 = upphafsrúmmál prófunarlausnarinnar sem er í snertingu við jarðveg (cm^3).

Gildin fyrir hundraðshluta ásogs A_{ti} eða $C_{aq}^{ads}(t_i)$ eru teiknuð á móti tíma og síðan er ákvarðaður sá tími sem líður þar til sogjafnvægi næst. Dæmi um línurit af þessu tagi eru sýnd á mynd 1. og 2, eftir því sem við á.



Mynd 1.

Línurit yfir ásogsjafnvægi



Mynd 2.

Massastyrkur prófunarefnis í vatnsfasanum (C_{aq}) á móti tíma

b) *Raðbundin aðferð*

Í eftirfarandi jöfnum er tekið tillit til þess að ásog er ákvarðað með mælingum á prófunarefninu í litlum deiliskömmtum úr vatnsfasanum með tilteknu millibili.

Magn þess efnis, sem ásogast í jarðvegi á hverju tímabili, er reiknað á eftirfarandi hátt:

— fyrir fyrsta tímabilið $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A}\right) \quad (4)$$

— fyrir annað tímabilið $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— fyrir þriðja tímabilið $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— fyrir n-tímabilið $\Delta t_n = t_n - t_n - 1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A\right)}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

Hundraðshluti ásogs á hverju tímabili $A_{\Delta ti}$ er reiknaður með eftirfarandi jöfnu:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

en hundraðshluti ásogs (A_{ti}) á tímapunktinum t_i er fundinn með jöfnunni:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Gildin fyrir ásog, A_{ti} eða $A_{\Delta ti}$, (eftir því sem rannsóknin krefst), eru teiknuð á móti tíma og síðan er ákvarðaður sá tími sem líður þar til sogjafnvægi næst.

Við jafnvægistímann t_{eq}:

— er massi prófunarefnis sem ásogast í jarðvegi:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

— massi prófunarefnis í lausninni er:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— og hundraðshluti ásogs við jafnvægi er:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Mæliþættirnir, sem eru notaðir hér að framan, eru skilgreindir á eftirfarandi hátt:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \ldots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = massi efnis sem ásogast í jarðvegi á tímabilunum $\Delta t_1, \Delta t_2, .., \Delta t_n$ eftir því sem við á (µg);

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \ldots, m_n^{ads}(t_n)$ = massi efnisins mældur í deiliskammti v_a^A á tímapunktunum t_1, t_2, t_n eftir því sem við á (µg),

$m_s^{ads}(eq)$ = massi efnis sem ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi (µg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massi efnis í lausn við ásogsjafnvægi (µg),

v_a^A = rúmmál deiliskammtsins sem prófunarefnið er mælt í (cm^3),

$A_{\Delta t_i}$ = hundraðshluti ásogs sem svarar til tímabilsins Δt_i (%),

A_{eq} = hundraðshluti ásogs við ásogsjafnvægi (%).

AFSOG D (A %)

Tíminn t_0, sem markar upphaf tilraunar fyrir hraðafræði afsogs, telst sá tímapunktur þegar mesta endurheimta rúmmál prófunarefnislausnarinnar (eftir að ásogsjafnvægi er náð) er bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn.

a) *Samhliða aðferð*

Á tímapunktinum t_i er massi prófunarefnisins mældur í vatnsfasanum sem er tekinn úr tilraunaglasi i (V_r^i) og afsogaður massi reiknaður samkvæmt jöfnunni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

Við afsogsjafnvægi er $t_i = t_{eq}$ og því er $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

Massi prófunarefnisins, sem afsogast á tímabilinu (Δt_i) er fundinn með jöfnunni:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Hundraðshluti afsogs er reiknaður:

á tímapunktinum t_i samkvæmt jöfnunni:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

og á tímabilinu (Δt_i) samkvæmt jöfnunni:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

þar sem:

D_{t_i} = hundraðshluti afsogs á tímapunktinum t_i (%),

$D_{\Delta t_i}$ = hundraðshluti afsogs sem svarar til tímabilsins Δt_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = massi prófunarefnis sem hefur afsogast á tímapunktinum t_i (µg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = massi prófunarefnis sem afsogast á tímabilinu Δt_i (µg),

$m_m^{des}(t_i)$ = massi prófunarefnis, mældur vegna greiningar á tímapunktinum t_i í lausn með rúmmálinu V_r^i, sem er tekin fyrir greininguna (µg),

m_{aq}^{A} = massi prófunarefnis sem verður eftir við ásogsjafnvægi vegna ófullkominna rúmmálsskipta (µg),

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = massi prófunarefnisins í lausninni við ásogsjafnvægi (µg),

V_R = rúmmál flotsins sem er tekið úr tilraunaglasinu eftir að ásogsjafnvægi hefur náðst og bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn (cm^3),

V_r^i = rúmmál lausnar sem tekin er úr tilraunaglasi (i) til að mæla prófunarefnið í tilraun fyrir hraðafræði afsogs (cm^3).

Gildin fyrir afsog, D_{ti} eða $D_{\Delta ti}$,(eftir því sem rannsóknin útheimtir), eru teiknuð á móti tíma og síðan er ákvarðaður sá tími sem líður þar til afsogsjafnvægi næst.

b) *Raðbundin aðferð*

Í eftirfarandi jöfnum er tekið tillit til þess að ásog er ákvarðað, eins og gert var á undan, með mælingum á prófunarefninu í litlum deiliskömmtum v_a^A í vatnsfasanum (raðbundin aðferð í „framkvæmd prófunarinnar“ í 1,9). Gert er ráð fyrir að: a) rúmmál flotsins, sem er tekið úr tilraunaglasinu eftir tilraunina fyrir hraðafræði ásogs, sé bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn (V_R) og b) að heildarrúmmál vatnsfasans, sem er í snertingu við jarðveg (V_T) meðan á prófuninni fyrir hraðafræði afsogs stendur, haldist stöðugt og það er fundið með jöfnunni:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

Á tímapunktinum t_i:

— Massi prófunarefnisins er mældur í litlum deiliskammti (v_a^D) og afsogaður massi reiknaður samkvæmt jöfnunni:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— Við afsogsjafnvægi er $t_i = t_{eq}$ og því er $m_{aq}(t_i) = m_{aq}(eq)$.

— Hundraðshluti afsogs D_{ti} er reiknaður samkvæmt eftirfarandi jöfnu:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

Á tímabilinu (Δt_i):

Magn þess efnis sem afsogast á hverju tímabili er reiknað á eftirfarandi hátt:

— fyrir fyrsta tímabilið $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ og } \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— fyrir annað tímabilið $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) \text{ and}$$
$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— fyrir n-tímabilið $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$
og
$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Að lokum er hundraðshluti afsogs á hverju tímabili, $D_{\Delta t_i}$, reiknaður með eftirfarandi jöfnu:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{24}$$

og hundraðshluti afsogs D_{ti} á tímapunktinum t_i er fundinn með jöfnunni:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

Mæliþættirnir hér að framan eru skilgreindar á eftirfarandi hátt:

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), ..., m_s^{des}(\Delta t_n)$ = massi efnis sem helst ásogað í jarðvegi eftir tímabilin Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n, eftir því sem við á (µg),

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), ..., m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = massi prófunarefnisins sem afsogast á tímabilunum Δt_1, Δt_2, ..., Δt_n, eftir því sem við á (µg)

$m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), ..., m_m^{des}(t_n)$ = massi efnisins mældur í deiliskammti (v_a^D) á tímapunktum t_1,t_2, ..., t_n, eftir því sem við á (µg)

V_T = heildarrúmmál vatnsfasans sem er í snertingu við jarðveg í tilraun fyrir hraðafræði afsogs sem er gerð með raðbundinni aðferð (cm^3),

m_{aq}^A = massi prófunarefnis sem verður eftir við ásogsjafnvægi vegna ófullkominna rúmmálsskipta (µg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = rúmmál flotsins sem er tekið úr tilraunaglasinu eftir að ásogsjafnvægi hefur náðst og bætt upp með sama rúmmáli af 0,01 M $CaCl_2$-lausn (cm^3),

v_a^D = rúmmál deilisýnis sem er tekið til efnagreiningar úr tilraunaglasi (i) í tilrauninni fyrir hraðafræði afsogs sem er gerð með raðbundinni aðferð (cm^3)

$$v_a^D \leq 0{,}02 \cdot V_T \quad (27)$$

6. viðbætir

ÁSOG OG AFSOG Í JARÐVEGI: SKÝRSLUEYÐUBLÖÐ

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður:

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig: ..... °C

Hentugleiki greiningaraðferðar

Vigtaður jarðvegur	g	
Jarðvegur: þurrmassi	g	
Rúmmál $CaCl_2$-lausnar	cm^3	
Nafnstyrkur endanlegrar lausnar	$\mu g\ cm^{-3}$	
Greiningarstyrkur endanlegrar lausnar	$\mu g\ cm^{-3}$	

Meginregla greiningaraðferðarinnar sem er notuð:

Kvörðun greiningaraðferðarinnar:

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig: ..... °C

Greiningaraðferð sem er notuð: Óbein ☐ Samhliða ☐ Raðbundin ☐

Bein ☐

Ásogsprófun: prófunarsýni

	Tákn	Einingar	Jafnvægistími		Jafnvægistími		Jafnvægistími		Jafnvægistími	
Númer tilraunaglass										
Vigtaður jarðvegur	—	g								
Jarðvegur: þurrmassi	m_{soil}	g								
Rúmmál vatns í vigtuðum jarðvegi (reiknað gildi)	VWS	cm^3								

	Tákn	Einingar	Jafnvægistími		Jafnvægistími		Jafnvægistími		Jafnvægistími	
Rúmmál 0,01 M $CaCl_2$-lausnar til að jarðvegur nái jafnvægi		cm^3								
Rúmmál stofnlausnar		cm^3								
Heildarrúmmál vatnsfasa í snertingu við jarðveg	V_0	cm^3								
Upphafsstyrkur prófunarlausnar	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$								
Massi prófunarefnis í upphafi prófunarinnar	m_0	µg								
Eftir hristing og skilvindu										
ÓBEIN AÐFERÐ										
Samhliða aðferð										
Styrkur prófunarefnis í vatnsfasa Blanksýnisleiðrétting meðtalin	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g\ cm^{-3}$								
Raðbundin aðferð										
Mældur massi prófunarefnis í deiliskammti V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
BEIN AÐFERÐ										
Massi prófunarefnis sem hefur ásogast í jarðvegi	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Útreikningur á ásogi										
Ásog	A_{ti}	%								
$A\Delta t_i$	%									
Meðalgildi										
Ásogsstuðull	K_d	$cm^3\ g^{-1}$								
Meðalgildi										
Ásogsstuðull	K_{oc}	$cm^3\ g^{-1}$								
Meðalgildi										

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður:

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig ..... °C

Ásogsprófun: blanksýni og samanburðarsýni

	Tákn	Einingar	Blanksýni		Blanksýni		Eftirlit	
Númer tilraunaglass								
Vigtaður jarðvegur		g					0	0
Vatnsmagn í vigtuðum jarðvegi (reiknað gildi)		cm^3					—	—
Rúmmál 0,01 M $CaCl_2$-lausnarinnar sem er bætt við		cm^3						
Rúmmál stofnlausnar prófunarefnisins sem er bætt við		cm^3	0	0				
Heildarrúmmál vatnsfasa (reiknað gildi)		cm^3					—	—
Upphafsstyrkur prófunarefnisins í vatnsfasa		$\mu g\ cm^{-3}$						
Eftir hristing og skilvindu								
Styrkur í vatnsfasa		$\mu g\ cm^{-3}$						

Athugasemd: Bætið við dálkum eftir þörfum.

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður:

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig ..... °C

Massajöfnuður

	Tákn	Einingar				
Númer tilraunaglass						
Vigtaður jarðvegur	—	g				
Jarðvegur: þurrmassi	m_{soil}	g				
Rúmmál vatns í vigtuðum jarðvegi (reiknað gildi)	VWS	ml				
Rúmmál 0,01 M $CaCl_2$-lausnar til að jarðvegur nái jafnvægi		ml				
Rúmmál stofnlausnar		cm^3				
Heildarrúmmál vatnsfasa í snertingu við jarðveg	V_0	cm^3				
Upphafsstyrkur prófunarlausnar	C_0	$\mu g\ cm^{-3}$				
Jafnvægistími	—	klst.				

Eftir hristing og skilvindu						
Styrkur prófunarefnis í vatnsfasa við ásogsjafnvægi, þ.m.t. blanksýnisleiðrétting	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Jafnvægistími	t_{eq}	klst.				
Fyrsta þynning með leysi						
Rúmmál vatnsfasans sem er fjarlægt	V_{rec}	cm^3				
Rúmmál viðbætts leysis	ΔV	cm^3				
Fyrsti útdráttur með leysi						
Greining merkis í leysi	S_{E1}	var.				
Styrkur prófunarefnis í leysi	C_{E1}	µg cm^{-3}				
Massi efnis sem er dregið út úr jarðvegi og af hliðum íláts	m_{E1}	µg				
Önnur þynning með leysi						
Rúmmál leysis sem er fjarlægt	ΔV_s	cm^3				
Rúmmál viðbætts leysis	$\Delta V'$	cm^3				
Annar útdráttur með leysi						
Greining merkis í leysisfasa	S_{E2}	var.				
Styrkur prófunarefnis í leysi	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Massi efnis sem er dregið út úr jarðvegi og af hliðum íláts	m_{E2}	µg				
Heildarmassi prófunarefnis sem er dregið út í tveimur þrepum	m_E	µg				
Massajöfnuður	MB	%				

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður:

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig: ..... °C

Ásogsferlar við fast hitastig

	Tákn	Einingar								
Númer tilraunaglass										
Vigtaður jarðvegur	—	g								
Jarðvegur: þurrmassi	E	g								

	Tákn	Einingar								
Rúmmál vatns í vigtuðum jarðvegi (reiknað gildi)	VWS	cm^3								
Rúmmál 0,01 M $CaCl_2$-lausnar til að jarðvegur nái jafnvægi		cm^3								
Rúmmál viðbættrar stofnlausnar		cm^3								
Heildarrúmmál vatnsfasa í snertingu við jarðveg (reiknað gildi)	V_0	cm^3								
Styrkur lausnar	C_0	µg cm^{-3}								
Jafnvægistími	—	klst.								
Eftir hristing og skilvindu										
Styrkur efnis í vatnsfasa, þ.m.t. blanksýnis-leiðrétting	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Hitastig	°C									
Ásogsmassi á hverja einingu jarðvegs	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Aðhvarfsgreining

gildi K_F^{ads}:

gildi l/n:

aðhvarfsstuðullinn r^2:

Efni sem er prófað:

Jarðvegur sem er prófaður:

Þurrefnisinnihald jarðvegsins (105 °C, 12 klst.): ..... %

Hitastig: ..... °C

Greiningaraðferð sem er notuð: Óbein ☐ Samhliða ☐ Raðbundin ☐

Afsogsprófun

		Tákn	Einingar	Tímabil	Tímabil	Tímabil	Tímabil
Númer tilraunaglass sem kemur úr ásogsþrepi							
Massi efnis sem hefur ásogast í jarðvegi við ásogsjafnvægi		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Rúmmál vatnsfasa sem var fjarlægt, og bætt upp með 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Heildarrúmmál vatnsfasa í snertingu við jarðveg	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				

	Tákn	Einingar	Tímabil	Tímabil	Tímabil	Tímabil
Massi prófunarefnis sem verður eftir þegar ásogsjafnvægi hefur náðst vegna ófullkominna rúmmálsskipta	m_{aq}^{A}	µg				

Hraðafræði afsogs

Mældur massi efnis sem hefur afsogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i		$m_{m}^{des}(t_i)$	µg				
Rúmmál lausnar sem tekin er úr tilraunaglasi (i) til að mæla prófunarefnið	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
Massi efnis sem hefur afsogast í jarðvegi á tímapunktinum t_i (reiknað gildi)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Massi efnis sem afsogast í jarðvegi á tímabilinu Δt_i (reiknað gildi)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

Hundraðshluti afsogs

Afsog á tímapunktinum t_i	D_{t_i}	%				
Afsog á tímabilinu Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Stuðull sýndarafsogs	K_{des}					

PM: samhliða aðferð

SM: raðbundinn aðferð

———

C.19. ÁKVÖRÐUN Á ÁSOGSSTUÐLI (K_{OC}) Í JARÐVEGI OG SKÓLPSEYRU MEÐ HÁÞRÝSTIVÖKVASKILJUN

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 121 um prófanir (2001).

1.1. INNGANGUR

Sogi efna í jarðvegi eða skólpseyru má lýsa með því að nota mæliþætti sem hafa verið ákvarðaðir í tilraunum með prófunaraðferðinni C.18. Ásogsstuðullinn, sem er skilgreindur sem hlutfallið milli styrks efnisins í jarðvegi eða skólpeðju og styrks efnisins í vatnsfasa við ásogsjafnvægi, er mikilvægur mæliþáttur. Ásogsstuðullinn, sem er jafnaður eftir innihaldi lífræns kolefnis í jarðveginum (K_{OC}), er gagnleg vísbending um getu íðefnis til að bindast lífrænu efni í jarðvegi og skólpseyru og gerir það kleift að bera mismunandi íðefni saman. Unnt er að meta þennan áhrifaþátt út frá fylgni við vatnsleysni og deilistuðul oktanóls-vatns (1.–7. heimild).

Í tilraunaaðferðinni, sem er lýst í þessari prófun, er notuð háþrýstivökvaskiljun til að meta ásogsstuðulinn K_{OC} í jarðvegi og í skólpseyru (8. heimild). Gildin, sem fást með þessu mati, eru áreiðanlegri en þau sem fást með útreikningum sem byggjast á megindlegum venslum efnabyggingar og virkni (QSAR) (9. heimild). Sem matsaðferð getur hún aldrei komið til fulls í stað hristi- og skilvinduaðferðar sem er notuð í prófunaraðferðinni C.18. Metna gildið fyrir K_{OC} getur þó komið að gagni við að velja viðeigandi prófunarmæliþætti fyrir rannsóknir á ásogi/afsogi samkvæmt prófunaraðferðinni C.18 með því að reikna K_d (dreifistuðul) eða K_f (ásogsstuðul Freundlichs) samkvæmt jöfnu 3 (sjá lið 1.2).

1.2. SKILGREININGAR

K_d: dreifistuðull er skilgreindur sem hlutfall jafnvægisstyrkja C af uppleystu prófunarefni í tveggja fasa kerfi, sem samanstendur af íseygu efni (jarðvegi eða skólpseyru) og vatnsfasa; hann er einingalaust gildi þegar styrkurinn í báðum fösum er gefinn upp sem þyngd á móti þyngd. Ef styrkleiki í vatnsfasanum er gefinn upp sem þyngd á móti rúmmáli eru einingarnar ml g^{-1}. K_d getur breyst eftir eiginleikum íseyga efnisins og getur verið háður styrknum.

$$K_d = \frac{C_{jarðvegur}}{C_{aq}} \text{ eða } \frac{C_{seyra}}{C_{aq}} \quad (1)$$

þar sem:

$C_{jarðvegur}$ = styrkur prófunarefnis í jarðvegi við jafnvægi (µg· g–1)
C_{seyra} = styrkur prófunarefnis í skólpeðju við jafnvægi (µg· g^{-1})
C_{aq} = styrkur prófunarefnis í vatnsfasa við jafnvægi (µg· g^{-1}, µg· ml^{-1}).

K_f: Ásogsstuðull Freundlichs er skilgreindur sem styrkur prófunarefnisins í jarðvegi eða skólpseyru (x/m) þegar jafnvægisstyrkurinn C_{aq} í vatnsfasanum er jafn einum; einingar eru µg.g^{-1} íseygt efni. Gildið getur breyst eftir eiginleikum íseyga efnisins.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\log C_{aq} \quad (2)$$

þar sem:

x/m = magn prófunarefnis x (µg) sem ásogast í tilteknu magni íseygs efnis m (g) við jafnvægi
1/n = halli ásogsferla Freundlichs við fast hitastig
C_{aq} = styrkur prófunarefnis í vatnsfasa við jafnvægi (µg ml^{-1})

$$\text{At } C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: dreifistuðull (K_d) eða ásogsstuðull Freundlichs (K_f) jafnaður eftir innihaldi lífræns kolefnis (f_{oc}) í íseygu efni; hann er nálgunarvísir, einkum fyrir ójónuð íðefni, fyrir umfang ásogs milli efnis og íseyga efnisins og gerir það kleift að bera mismunandi íðefni saman. Það fer eftir stærð K_d og K_f, hvort K_{oc} er einingalaus eða gefinn upp með einingunum ml g^{-1} eða µg g^{-1} lífræns efnis.

$$Koc = \frac{Kd}{foc} \quad \text{(einingalaus eða ml·g}^{-1}\text{) eða} \quad \frac{Kf}{foc}(\mu g \cdot g^{-1}) \qquad (3)$$

Venslin milli K_{oc} og K_d eru ekki alltaf línuleg og því geta gildi fyrir K_{oc} verið breytileg eftir jarðveginum en breytileiki þeirra er þó miklu minni en á gildunum á K_d eða K_f.

Ásogsstuðullinn (K_{oc}) er leiddur af rýmdarstuðlinum (k') með því að nota kvörðunarferil log k' á móti log K_{oc} fyrir valin viðmiðunarefnasambönd.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \qquad (4)$$

þar sem:

t_R = rástími prófunar- og viðmiðunarefnis (í mínútum) í háþrýstivökvaskiljun,
t_0 = óvirkur tími í háþrýstivökvaskiljun (í mínútum) (sjá lið 1.8.2).

P_{ow}: Deilistuðull oktanóls-vatns er skilgreindur sem hlutfallið á milli styrkleika uppleysts efnis í n-oktanóli og vatni; hann er einingalaust gildi.

$$Pow = \frac{Coctanol}{Caq} (= Kow) \qquad (5)$$

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Byggingarformúla, hreinleiki og klofnunarstuðull (ef við á) skulu þekkt áður en aðferðin er notuð. Gagnlegt er að afla upplýsinga um leysni í vatni og lífrænum leysum, um deilistuðul oktanóls-vatns og um vatnsrofseiginleika.

Til að fá fram fylgni milli mæligilda fyrir rástíma tiltekins prófunarefnis í háþrýstivökvaskiljun við ásogsstuðul þess, K_{oc}, verður að setja upp kvörðunargraf log K_{oc} á móti log k'. Nota skal minnst sex viðmiðunarpunkta, a.m.k. einn fyrir ofan og einn fyrir neðan það gildi sem búist er við að prófunarefnið hafi. Aðferðin verður miklu nákvæmari ef notuð eru viðmiðunarefni sem eru byggingarlega skyld prófunarefninu. Séu slík gögn ekki fyrir hendi er það notandans að velja viðeigandi kvörðunarefni. Í því tilviki er rétt að velja nokkur efni sem eru ólík að byggingu. Efni og K_{oc}-gildi , sem hægt er að nota, eru talin upp í viðbætinum í töflu 1 fyrir skólpseyru og í töflu 3 fyrir jarðveg. Val annarra kvörðunarefna skal rökstutt.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Í háþrýstivökvaskiljun eru notaðar greiningarsúlur sem í er þjappað sýanóprópýli í föstum fasa sem fæst á almennum markaði og inniheldur fitusækinn hluta og skautaðan hluta. Notaður er meðalskautaður stöðufasi þar sem kísill er uppistöðuefni:

— O — Si	— CH_2 — CH_2 — CH_2	— CN
kísl	óskautað milliefni	skautaður hluti

Meginregla prófunaraðferðarinnar er svipuð og í prófunaraðferð A.8 (deilistuðull, háþrýstivökvaskiljun). Þegar prófunarefnið fer í gegnum súluna ásamt ferðafasanum verður víxlverkun milli þess og stöðufasans. Efnið deilist á ferðafasann og stöðufasann og við það hægir á för þess. Tvíþætt samsetning stöðufasans, sem er bæði með skautuð og óskautuð bindiset, veldur því að víxlverkun getur orðið milli skautaðra og óskautaðra hópa sameindar á líkan hátt og hjá lífrænu efni þar sem jarðvegur eða skólpseyra er uppistöðuefnið. Þetta gerir kleift að ákvarða sambandið milli rástíma í súlunni og ásogsstuðulsins í lífrænu efni.

Sýrustig hefur marktæk áhrif á sogeiginleika, einkum þegar um er að ræða skautuð efni. Þegar um er að ræða nytjajarðveg eða þrær í skólphreinsistöðvum er pH-gildið venjulega á bilinu 5,5 til 7,5. Þegar um er að ræða efni sem geta jónast skal gera tvær prófanir, bæði með jónað og ójónað form efnisins, í viðeigandi jafnalausnum en þó aðeins í þeim tilvikum þegar a.m.k. 10% af prófunarefnasambandinu klofna á pH-gildisbilinu 5,5 til 7,5.

Þar eð matið byggist einvörðungu á venslunum milli rásar í súlu í háþrýstivökvaskiljun og ásogsstuðulsins er ekki þörf á megindlegri greiningaraðferð og einungis er nauðsynlegt að ákvarða rástímann. Ef hentugt safn viðmiðunarefna er fyrir hendi og unnt er að nota stöðluð tilraunaskilyrði er þetta fljótleg og árangursrík aðferð til að meta ásogsstuðulinn K_{oc}.

1.5. NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Háþrýstivökvaskiljunaraðferð hentar fyrir íðefni (ómerkt eða merkt) sem hægt er að greina með viðeigandi búnaði (t.d. litrófsmæli, geislavirkninema) og eru nægilega stöðug þann tíma sem tilraunin varir. Hún getur einkum verið gagnleg fyrir íðefni sem er erfitt að rannsaka í öðrum tilraunakerfum (þ.e. rokgjörn efni, efni sem eru ekki leysanleg í vatni í styrk sem hægt er að mæla, efni sem eru mjög sækin í yfirborð ræktunarkerfa). Aðferðina er hægt að nota fyrir blöndur sem gefa óaðgreinanlega skolunartoppa. Í slíku tilviki skal tilgreina efri og neðri mörk log K_{oc}-gilda efnasambandanna í prófunarblöndunni.

Stundum eru óhreinindi til vandræða við túlkun á niðurstöðum úr háþrýstivökvaskiljun en þau skipta litlu máli ef greiningin leiðir skýrt í ljós hvert prófunarefnið er og ef hægt er að skilja það frá óhreinindunum.

Aðferðin er fullgilt fyrir íðefnin sem eru talin upp í töflu 1 í viðbætinum og hefur einnig verið notuð fyrir ýmis önnur íðefni sem tilheyra eftirfarandi íðefnaflokkum:

— arómatísk amín (t.d. tríflúralín, 4-klóranilín, 3,5-dínítróanilín, 4-metýlanilín, N-metýlanilín og 1-naftýlamín),

— arómatískir karboxýlsýruesterar (t.d. bensósýrumetýlester og 3.5 dínítróbensósýruetýlester),

— arómatísk vetniskolefni (t.d. tólúen, xýlen, etýlbensen og nítróbensen),

— aryloxýfenoxýpróþíonsýruesterar (t.d. díklófópmetýl, fenoxapropetýl og fenoxapróp-P-etýl),

— bensímídasól- og imídasólsveppaeyðar (t.d. karbendasím, fúberídasól og tríasoxíð),

— karboxýlsýrramíð (t.d. 2-klórbensamíð, N,N-dímetýlbensamíð, 3,5-dínítróbensamíð, N-methýl-bensamíð, 2-nítróbensamíð og 3-nítróbensamíð),

— klóruð vetniskolefni (t.d. endósúlfan, DDT, hexaklórbensen, kvintósen og 1,2,3,-tríklórbensen),

— fosfórlífræn skordýraeitur (t.d. asínfosmetýl, dísúlfóton, fenamífos, ísófenfos, pýrasófos, súlprófos og tríasófos),

— fenól (t.d. fenól, 2-nítrófenól, 4-nítrófenól, pentaklórfenól, 2,4,6-tríklórfenól og 1-naftól),

— afleiður fenýlúrea (t.d. ísóprótúron, mónólínúron og pensýkúron),

— fastlitarefni (t.d. Acid Yellow 219, Basic Blue 41 og Direct Red 81),

— fjölarómatísk vetniskolefni (t.d. asenaften og naftalen),

— illgresiseyðar að stofni til úr 1,3,5-tríasíni (t.d. prómetrýn, própasín, símasín og terbútrín),

— tríasólafleiður (t.d. tebúkónasól, tríadímefón, tradímenól og tríapentenól).

Aðferðin hentar ekki fyrir efni sem hvarfast hvorki við skiljuvökvann né stöðufasann. Hún hentar heldur ekki fyrir efni sem sýna sértæka víxlverkun við ólífræna efnisþætti (s.s. myndun klasaflóka með leirsteindum). Ekki er víst að hægt sé að nota aðferðina fyrir yfirborðsvirk efni, ólífræn efnasambönd eða

meðalsterkar eða sterkar lífrænar sýrur og basa. Hægt er að ákvarða log K_{oc}-gildi á bilinu 1,5 til 5,0. Jónanleg efni skulu mæld með jöfnuðum ferðafasa en þess skal gætt að efnisþættir jafnalausnarinnar eða prófunarefnisins falli ekki út.

1.6. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.6.1. **Nákvæmni**

Að jafnaði er unnt að meta ásogsstuðul prófunarefnis svo ekki víki meira en ± 0,5 lograeiningar frá gildinu sem er ákvarðað með hristi- og skilvinduaðferðinni (sjá töflu 1 í viðbætinum). Unnt er að ná meiri nákvæmni ef notuð eru viðmiðunarefni sem eru byggingarlega skyld prófunarefninu.

1.6.2. **Endurtekningarnákvæmni**

Ákvarðanir skulu a.m.k. tvíteknar. Gildi á log K_{oc} úr einstökum mælingum skulu liggja á bili sem svarar til ± 0,25 lograeininga.

1.6.3. **Samanburðarnákvæmni**

Reynsla sem fengist hefur fram til þessa af beitingu aðferðarinnar rennir stoðum undir gildi hennar. Rannsókn á háþrýstivökvaskiljunaraðferðinni með 48 efnum (aðallega varnarefnum), sem til voru áreiðanleg gögn um, að því er varðar K_{oc} fyrir jarðveg, gáfu fylgnistuðulinn R = 0,95 (10. og 11. heimild).

Ellefu rannsóknarstofur tóku þátt í fjölsetra samanburðarprófun sem gerð var til að bæta og fullgilda aðferðina (12. heimild). Niðurstöðurnar koma fram í töflu 2 í viðbætinum.

1.7. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.7.1. **Bráðabirgðamat á ásogsstuðlinum**

Unnt er að nota deilistuðul oktanóls-vatns, P_{ow} (= K_{ow}), og, að einhverju leyti, vatnsleysnina sem vísbendingar um umfang ásogs, einkum fyrir ójónuð efni, og þar með til að finna skammtastærðir til bráðabirgða. Ýmiss konar samsvörun fyrir fjölmarga flokka íðefna er að finna í ýmsum ritum (1.–7. heimild).

1.7.2. **Búnaður**

Nota þarf vökvaskilju með sláttarlausri dælu og hentugum skynjarabúnaði. Ráðlegt er að nota inngjafarloka með inngjafarlykkju. Nota skal sýanóprópýlresín, tengd með efnatengjum og að uppistöðu úr kísilefnum, sem fást á almennum markaði (t.d. Hypersil og Zorbax CN). Setja má forsúlu úr sama efni milli inngjafarkerfisins og greiningarsúlunnar. Mikill munur getur verið á skiljunargetu greiningarsúlna frá mismunandi birgjum. Til leiðsagnar skal ná eftirfarandi rýmdarstuðlum k': log k' > 0,0 fyrir log K_{oc} = 3,0 og log k' > — 0,4 fyrir log K_{oc} = 2,0 þegar metanól/vatn, 55/45% er notað sem ferðafasi.

1.7.3. **Ferðafasar**

Prófaðir hafa verið ýmsir ferðafasar og er mælt með þessum tveimur:

— metanól/vatn (í rúmmálshlutfallinu 55/45%)

— metanól/0,01 M sítratjafnalausn, pH-gildi 6,0 (í rúmmálshlutfallinu 55/45%).

Til að útbúa skolleysinn er notað metanól af hreinleika fyrir háþrýstivökvaskiljun og eimað vatn eða sítratjafnalausn. Allt gas er fjarlægt úr blöndunni fyrir notkun. Við skolun skal nota fastan ferðafasa. Ef blöndur af metanóli og vatni henta ekki má nota annars konar blöndur af lífrænum leysum og vatni, t.d. etanól og vatn eða asetónítríl og vatn. Þegar um er að ræða jónanleg efnasambönd er ráðlegt að nota jafnalausn til að stöðga sýrustigið. Þess skal gætt að forðast saltútfellingar og skemmdir á súlunni sem geta orðið þegar notaðar eru tilteknar blöndur af lífrænum fösum og jafnalausnum.

Ekki er heimilt að nota aukefni á borð við jónaparsprófefni þar eð þau geta haft áhrif á sogeiginleika stöðufasans. Slíkar breytingar á stöðufasanum geta verið varanlegar. Af þessum sökum er skyldubundið að nota aðskildar súlur í tilraunum þar sem aukefni eru notuð.

1.7.4. **Uppleyst efni**

Prófunar og viðmiðunarefnin skulu vera uppleyst í ferðafasanum.

1.8. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.8.1. **Prófunarskilyrði**

Skrá skal hitastig meðan mælingar standa yfir. Eindregið er mælt með því að notað sé hitastýrt súluhólf til að tryggja jöfn skilyrði við keyrslur vegna kvörðunar og mats og við mælingar á prófunarefninu.

1.8.2. **Ákvörðun súlutíma t_o**

Til að ákvarða súlutíma er hægt að nota tvær ólíkar aðferðir (sjá einnig lið 1.2).

1.8.2.1. *Ákvörðun á súlutíma t_o með raðkvæmaröð*

Þessi aðferð hefur reynst skila áreiðanlegum og stöðluðum gildum fyrir t_o. Sjá nánar undir prófunaraðferð A.8: Deilistuðull (n-oktanól/vatn), háþrýstivökvaskiljun.

1.8.2.2. *Ákvörðun á súlutíma t_o með óvirkum efnum sem sitja ekki eftir á súlunni*

Þessi tækni byggist á innsprautun formamíð, þvagefnis eða natríumnítratlausna. Mælingar skulu a.m.k. tvíteknar.

1.8.3. **Ákvörðun rástímanna t_R**

Viðmiðunarefni skulu valin eins og lýst er í lið 1.3. Þeim má sprauta inn sem blönduðum staðli til að ákvarða rástíma þeirra, að því tilskildu að staðfest hafi verið að rástími hvers viðmiðunarstaðals verði ekki fyrir áhrifum frá öðrum viðmiðunarstöðlum sem eru til staðar. Kvarða skal með reglulegu millibili, a.m.k. tvisvar á dag, svo tekið sé tillit til óvæntra breytinga á greiningarhæfni súlunnar. Samkvæmt bestu starfsvenjum skal innsprautun vegna kvörðunar fara fram fyrir og eftir innsprautun prófunarefnisins til að staðfesta að rástímarnir hafi ekki breyst. Prófunarefnunum er sprautað inn, hverju fyrir sig, í eins litlu magni og unnt er (til að komast hjá yfirálagi á súluna) og rástímar þeirra ákvarðaðir.

Til þess að auka áreiðanleika mælinganna skulu ákvarðanirnar a.m.k. tvíteknar. Gildi á log K_{oc} úr einstökum mælingum skulu liggja á bili sem svarar til ± 0,25 lograeininga.

1.8.4. **Mat**

Rýmdarstuðlarnir, k', eru reiknaðir út frá súlutíma, t_0, og rástímum, t_R, völdu viðmiðunarefnanna samkvæmt jöfnu 4 (sjá lið 1.2). Gildi á log k' fyrir viðmiðunarefnin eru því næst teiknuð á móti gildum á log K_{oc} úr prófunum með hristi- og skilvinduaðferð sem er að finna í töflu 1 og 3 í viðbætinum. Þessi ferill fyrir gildi á log k' fyrir prófunarefnið er síðan notaður til að ákvarða gildið á log K_{oc}. Sýni niðurstöður í raun að gildi á log K_{oc} fyrir prófunarefnið liggi utan kvörðunarsviðsins skal endurtaka prófunina með öðrum og hentugri viðmiðunarefnum.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í skýrslunni:

— auðkenni prófunar og viðmiðunarefnanna og hreinleiki og, ef við á, gildi fyrir pK_a þeirra,

— lýsing á búnaði og vinnsluskilyrðum, t.d. tegund og mál greiningarsúlunnar (og forsúlunnar), greiniaðferðir, ferðafasi (hlutfall efnisþátta og sýrustig) og hitasvið í mælingum,

— súlutími og aðferðin sem er notuð til að ákvarða hann,

— magn prófunar- og viðmiðunarefna sem sett er í súluna,

— rástímar viðmiðunarefnasambanda sem eru notuð til kvörðunar,

— upplýsingar um bestu aðhvarfslínu (log k' á móti log K_{oc}) og ferill aðhvarfslínunnar,

— upplýsingar um meðalrástíma og áætlað gildi d log K_{oc} fyrir prófunarefnasambandið,

— skiljurit.

3. **HEIMILDIR**

1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed), (1990) Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 4, McGraw-Hill, New York.

2) J. Hodson, N.A. Williams, (1988) The estimation of the adsorption coefficient (Koc) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, bls. 167.

3) G.G. Briggs, (1981) Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, bls. 1050-1059.

4) C.T. Chiou, P.E. Porter, D.W. Schmedding, (1983) Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, bls. 227-231.

5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984) Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, bls. 297-312.

6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed, (1979) A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, bls. 831-832.

7) S.W. Karickhoff, (1981) Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, bls. 833-846.

8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann, (1997) Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), bls. 121-128.

9) M. Mueller, W. Kördel (1996) Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), bls. 2493-2504.

10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), bls. 2341-2352.

11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991) Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, bls. 285-304.

12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995) HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), bls. 1373-1384.

Viðbætir

Tafla 1

Samanburður á gildum á K_{oc} fyrir jarðveg og skólpseyru og reiknuðum gildum sem fengin eru með aðferð til skimunar með háþrýstivökvaskiljun ([1]), ([2])

Efni	CAS-númer	log K_{oc} skólpseyra	log K_{oc} háþrýstivökva-skiljun	Δ	log K_{oc} jarðvegur	log K_{oc} háþrýstivökva-skiljun	Δ
Atrasín	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Línúrón	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenþíón	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Mónúrón	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantren	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensósýrufenýlester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamíð	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nítróbensamíð	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Asetanilíð	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilín	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-díklóranilín	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann, (1997) Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), bls. 121-128.

([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke, (1997) Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), bls. 107-119.

Tafla 2

Niðurstöður úr samanburðarprófun rannsóknarstofa (11 rannsóknarstofur tóku þátt í prófuninni) sem gerð var til að bæta og fullgilda háþrýstivökvaskiljunaraðferðina ([1]).

Efni	CAS-númer	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		(OECD 106)	(háþrýstivökvaskiljunaraðferð)	
Atrasín	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Mónúrón	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Tríapentenól	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Línúrón	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenþíón	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.

Tafla 3

Ráðlögð viðmiðunarefni, á grundvelli gagna um ásog í jarðvegi, fyrir aðferð til skimunar með háþrýstivökvaskiljun

Viðmiðunarefni	CAS-númer	Meðalgildi log K_{oc} með hristi- og skilvinduaðferð	Númer K_{oc}-gagna	Logri staðalfráviks	Uppruni
Asetanilíð	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenól	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-nítróbensamíð	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N.N-dímetýlbensamíð	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metýlbensamíð	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metýlbensóat	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrasín	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Ísóprótúrón	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nítróbensamíð	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilín	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dínítróbensamíð	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendasím	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Tríadímenól	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Tríasoxíð	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Tríasófos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Línúrón	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalín	91-20-3	2,75	4	2,20	(c)
Endósúlfandíól	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metíókarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-tríklórbensen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenþíón	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pýrasófos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-endósulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Díklófópmetýl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantren	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (blanda)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein., (1991) Chemosphere, 22, bls. 285-304.

(c) Gögn frá iðnfyrirtækjum.

C.20 *ÆXLUNARPRÓFUN Á DAPHNIA MAGNA*

1. AÐFERÐ

Þessi prófun á eiturhrifum á æxlun er sama sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu TG 211 um prófanir (1998).

1.1. INNGANGUR

Meginmarkmiðið með þessari prófun er að meta áhrif íðefna á viðkomu *Daphnia magna*.

1.2. SKILGREININGAR OG EININGAR

Undaneldisdýr: eru þær kvenkyns halaflær sem eru fyrir hendi í upphafi prófunarinnar og er markmið prófunarinnar að rannsaka viðkomu þeirra.

Afkvæmi: ungar halaflær sem undaneldisdýrin geta af sér í prófuninni.

Minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif (LOEC): er minnsti prófaði styrkur þar sem efnið reynist hafa tölfræðilega marktæk áhrif á æxlun og dánarhlutfall undaneldisdýra (við $p < 0,05$) miðað við samanburðarhópinn innan tilgreinds váhrifatímabils,. Allur prófunarstyrkur sem er yfir minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif verður þó að valda jafnmiklum eða meiri skaðlegum áhrifum en fram koma við minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif. Sé ekki hægt að uppfylla þessi tvö skilyrði skal skýra til fulls hvernig staðið var að vali á minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif (og þar með vali á styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif).

Styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif (NOEC): er sá prófunarstyrkur sem er minni en minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif og hefur engin tölfræðilega marktæk áhrif ($p < 0,05$) miðað við samanburðarhópinn innan tilgreinds váhrifatímabils.

EC_x: er sá styrkur prófunarefnisins, uppleyst í vatni, sem veldur x% samdrætti í æxlun hjá *Daphnia magna* á tilgreindum váhrifatíma.

Vaxtarhraði stofns: er mælikvarði á stofnvöxt sem samþættir viðkomu og aldursháð dauðsföll (20.–22. heimild). Hjá stofnum í jafnvægi er þetta gildi núll. Fyrir stofna í vexti er gildið jákvætt en neikvætt fyrir minnkandi stofna. Ljóst má vera að síðarnefndi stofninn er ekki sjálfbær og hann deyr að lokum út.

Greiningarmörk: eru minnsti styrkur sem unnt er að greina en ekki magngreina.

Magngreiningarmörk: eru minnsti styrkur sem hægt er að magngreina.

Dánartíðni: dýr er skráð dautt ef það er hreyfingarlaust, þ.e. dýrið getur ekki synt, eða ef útlimir þess hreyfast ekki eða engin hreyfing sést í aftanverðu kviðarholi þess fyrstu 15 sekúndurnar eftir að prófunarílátið er hrist varlega. (Sé önnur skilgreining notuð skal gera grein fyrir henni og vísa til heimildarinnar um hana.)

1.3. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Ungar, kvenkyns halaflær (undaneldisdýr), sem eru innan við 24 klukkustunda gamlar þegar prófun hefst, eru látnar verða fyrir váhrifum af prófunarefni sem er bætt út í vatn í röð styrkbila. Lengd prófunarinnar er 21 dagur. Við lok prófunarinnar er fundinn heildarfjöldi lifandi afkvæma, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, sem er á lífi í lok prófunarinnar. Það merkir að ungviði sem fullvaxin dýr, sem drepast í prófuninni, geta af sér eru ekki tekin með í reikninginn. Viðkomu undaneldisdýra má gefa upp á annan hátt (t.d. sem fjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr getur af sér á dag frá þeim degi að telja að fyrst varð vart við afkvæmi) en gera skal grein fyrir því auk heildarfjölda ungviðis, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, sem er á lífi í lok prófunarinnar. Viðkoma dýra, sem hafa orðið fyrir váhrifum af prófunarefninu, er borin saman við viðkomu samanburðarhóps eða hópa til að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif og síðan styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif. Auk þess eru gögnin, að því marki sem unnt er, greind með því að nota aðhvarfslíkan til að meta styrkinn sem veldur x% minnkun á viðkomu (þ.e. EC_{50}, EC_{20} eða EC_{10}).

Einnig skal greina frá lifun undaneldisdýranna og tímann fram að fyrstu afkvæmum. Einnig má rannsaka önnur efnistengd áhrif á mæliþætti, s.s. vöxt (t.d. lengd) og jafnvel vaxtarhraða stofnsins.

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Niðurstöður úr prófun á bráðum eiturhrifum (sjá aðferð C.2 í I. hluta), sem gerð hefur verið á *Daphnia magna*, skulu liggja fyrir. Niðurstöðurnar geta reynst gagnlegar við val á viðeigandi röð prófunarstyrkleika í æxlunarprófunum. Vatnsleysni og gufuþrýstingur prófunarefnisins skulu vera þekkt og áreiðanleg greiningaraðferð fyrir magngreiningu efnisins í prófunarlausnunum, með skráða endurheimtargetu og magngreiningarmörk, fyrir hendi.

Upplýsingar um prófunarefnið, sem geta verið gagnlegar við ákvörðun á skilyrðum í prófuninni, eru m.a. byggingarformúla, hreinleiki efnisins, stöðugleiki í ljósi, stöðugleiki við prófunarskilyrðin, pKa, P_{ow} og niðurstöður prófunar á auðlífbrjótanleika (sjá aðferð C.4).

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Til að prófun teljist gild skal samanburðarhópurinn eða hóparnir uppfylla eftirfarandi viðmiðanir:

— dánarhlutfall hjá undaneldisdýrunum (kvenkyns halaflóm) er ekki meira en 20% við lok prófunar,

— meðalfjöldi lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem er á lífi í lok prófunar, getur af sér er ≥ 60.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Prófunarílát og annar búnaður sem kemst í snertingu við prófunarlausnirnar skulu eingöngu vera úr gleri eða öðru efnafræðilega óvirku efni. Alla jafna eru prófunarílátin bikarglös úr gleri.

Auk þess verður þörf fyrir eftirfarandi búnað, að hluta eða öllu leyti:

— súrefnismæli (með örskauti eða öðrum hentugum búnaði til að mæla uppleyst súrefni í sýnum með lítið rúmmál),

— fullnægjandi búnað til hitastýringar,

— sýrustigsmæli,

— búnað til að ákvarða hörku vatns,

— búnað til að ákvarða heildarmagn lífræns kolefnis (TOC) í vatni eða búnaði til að ákvarða efnafræðilega súrefnisþörf (COD),

— fullnægjandi búnað til að stjórna lýsingu og mæla ljósstyrk.

1.6.2. **Prófunarlífvera**

Í prófuninni skal nota tegundina *Daphnia magna Straus*. Nota má aðrar tegundir halaflóa svo fremi að þær uppfylli gildisviðmiðanir eins og við á (gildisviðmiðun, sem varðar viðkomu í samanburðarhópunum, skiptir máli fyrir þessa tegund halaflóa). Ef önnur tegund halaflóa er notuð skal koma skýrt fram hver hún er og notkun hennar skal rökstudd.

Helst skal klónið hafa verið sanngreint með arfgerðargreiningu. Rannsóknir (1. heimild) hafa leitt í ljós að tímgunargeta klónsins A (sem kemur frá IRCHA í Frakklandi) (3. heimild) uppfyllir ávallt gildisviðmiðun um meðaltalið ≥ 60 afkvæmi á hvert undaneldisdýr sem lifir prófunina af þegar það er ræktað við þau skilyrði sem er lýst í þessari aðferð. Þó má nota önnur klón að því tilskildu að sýnt sé fram á að halaflóaræktunin uppfylli gildisviðmiðanir fyrir prófun.

Í upphafi prófunar skulu halaflærnar vera yngri en 24 klukkustunda og þær mega ekki vera afkvæmi fyrstu afkvæma. Þær skulu vera úr heilbrigðum stofni (þ.e. ekki sýna nein merki um streitu, s.s. háa dánartíðni, karldýr og söðulhýði, seinkun á tilkomu fyrstu afkvæma, mislit dýr o.s.frv.). Stofndýrin skulu haldin við sambærileg ræktunarskilyrði (lýsing, hitastig, miðill, fóðrun og dýr á hverja rúmmálseiningu) og þau sem nota skal í prófuninni. Ef ræktunarmiðill halaflónna sem á að nota í prófuninni er annar miðill en er notaður í venjubundinni halaflóaræktun er það góð starfsvenja að bæta við aðlögunartímabili fyrir prófunina, sem er að jafnaði þrjár vikur (þ.e. ein kynslóð), til að varna því að streita herji á undaneldisdýrin.

1.6.3. **Prófunarmiðill**

Mælt er með að nota fullskilgreindan miðil í þessari prófun. Með því má komast hjá notkun aukefna, sem er erfitt að lýsa (t.d. þangi og þara, jarðvegsútdrætti o.s.frv.), og bæta þannig möguleikana á stöðlun milli rannsóknarstofa. Í þessu skyni hefur miðillinn Elendt M4 (4. heimild) og M7 (sjá 1. viðbæti) reynst vel. Þó má nota aðra miðla (t.d. 5. og 6. heimild) að því tilskildu að sýnt sé fram á að árangur halaflóaræktunarinnar uppfylli gildisviðmiðanir prófunarinnar.

Ef notaðir eru miðlar sem innihalda óskilgreind aukefni skal tilgreina þessi aukefni á ótvíræðan hátt og gefa upplýsingar um samsetningu þeirra í prófunarskýrslunni, einkum að því er varðar kolefnisinnihald þar eð það getur orðið viðbót við fæðuna sem gefin er. Mælt er með því að ákvarða heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðilega súrefnisþörf í stofnlausn lífræna aukefnisins og meta síðan viðbótina sem af því leiðir á heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðilega súrefnisþörf í prófunarmiðlinum. Mælt er með því að heildarmagn lífræns kolefnis í miðlinum (þ.e. áður en þörungunum er bætt við) sé undir 2 mg/l (7. heimild).

Við prófun efna, sem innihalda málma, er mikilvægt að gera sér grein fyrir því að eiginleikar prófunarmiðilsins (t.d. harka og klóbindihæfni) geta haft áhrif á eiturhrif prófunarefnisins. Því er æskilegt að notaður sé fullskilgreindur miðill. Sem stendur eru Elendt M4 og M7 þó einu dæmin um fullskilgreindan miðil sem vitað er að henta til langtímaræktunar halaflóa af tegundinni *Daphnia magna*. Báðir miðlar innihalda klóbindiefnið etýlendíamíntetraasetat (EDTA). Rannsóknir hafa sýnt (2. heimild) að „sýndareiturhrif“ kadmíums eru að jafnaði minni þegar æxlunarprófunin fer fram í miðlunum M4 og M7 en í miðlum sem innihalda ekki etýlendíamíntetraasetat. Því er ekki mælt með að nota M4 og M7 til að prófa efni sem innihalda málma og einnig skal forðast aðra miðla sem innihalda þekkt klóbindiefni. Þegar um er að ræða efni sem innihalda málma getur verið ráðlegt að nota annan miðil, t.d. endurgert, hart ferskvatn samkvæmt ASTM (7. heimild), sem inniheldur ekki etýlendíamíntetraasetat, með viðbættum útdrætti úr þangi og þara (8. heimild). Þessi samsetning af endurgerðu, hörðu ferskvatni samkvæmt ASTM og útdrætti úr þangi og þara hentar einnig fyrir langtímaræktun og prófun *Daphnia magna* (2. heimild) þó að hún hafi enn væga klóbindiverkun vegna lífræna efnisþáttarins í útdrættinum úr þangi og þara sem bætt er við.

Í upphafi prófunar og meðan á henni stendur skal styrkur uppleysts súrefnis vera yfir 3 mg/l. pH-gildi skal vera á bilinu 6–9 og frávik skal að jafnaði ekki vera meira en 1,5 einingar í hverri einstakri prófun. Mælt er með því að harka sé yfir 140 mg/l (sem $CaCO_3$). Prófanir með þessu gildi og þar yfir hafa leitt í ljós tímgunargetu sem er í samræmi við gildisviðmiðanirnar (9. og 10. heimild).

1.6.4. **Prófunarlausnir**

Prófunarlausnir með styrknum sem valinn hefur verið eru yfirleitt búnar til með því að þynna stofnlausn. Æskilegast er að tilreiða stofnlausnir með því að leysa efnið upp í prófunarmiðli.

Í tilteknum tilvikum kann að vera nauðsynlegt að nota lífræna leysa eða dreifiefni til að fá stofnlausn af hæfilegum styrkleika en forðast skal eftir því sem unnt er að nota slík efni. Dæmi um heppilega leysa eru aseton, etanól, metanól, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól. Dæmi um heppileg dreifiefni eru Cremophor RH40, 0,0% metýlsellulósi og HCO-40. Prófunarefnið í prófunarlausnunum skal þó aldrei fara yfir leysnimörkin í prófunarmiðlinum.

Leysar eru notaðir til að búa til stofnlausn sem unnt er að bæta út í vatn í nákvæmum skömmtum. Ef framangreindir leysar eru í ráðlögðum styrk í endanlega prófunarmiðlinum (þ.e. $\leq$ 0,1 ml/l) eru þeir ekki eitraðir og auka ekki vatnsleysni efnis.

Dreifiefni geta stuðlað að nákvæmri skömmtun og dreifingu. Ef framangreind dreifiefni eru í ráðlögðum styrk í endanlega prófunarmiðlinum ($\leq$ 0,1 ml/l) eru þau ekki eitruð og auka ekki vatnsleysni efna.

1.7. TILHÖGUN PRÓFUNAR

Nota skal slembiaðferð við ísetningu í prófunarílátin og alla síðari meðhöndlun þeirra. Sé það ekki gert getur það valdið bjögun sem hægt er að túlka sem áhrif á styrkleika. Einkum geta áhrif sem tengjast tíma, s.s. þreyta starfsmanns eða aðrar skekkjur, leitt til meiri áhrifa við meiri styrkleika ef tilraunaeiningar eru meðhöndlaðar í meðhöndlunar- eða styrkleikaröð. Ef líklegt er að aðstæður í upphafi eða umhverfisaðstæður við prófunina, s.s. staðsetning í rannsóknarstofunni, hafi áhrif á prófunarniðurstöður skal vega það og meta að skipta prófuninni niður í blokkir.

1.8. VERKFERLI

1.8.1. **Váhrifaskilyrði**

1.8.1.1. *Tímalengd*

Lengd prófunarinnar er 21 dagur.

1.8.1.2. *Hleðsla*

Undaneldisdýrum er haldið aðskildum, einu í hverju prófunaríláti, með 50–100 ml af miðli í hverju íláti.

Stundum útheimtir greiningaraðferðin, sem er notuð til að ákvarða styrk prófunarefnisins, meira rúmmál þó að einnig sé heimilt að sameina samhliða sýni til efnagreiningar. Ef rúmmálið er yfir 100 ml þarf að auka skammtinn, sem halaflónum er gefinn, til að tryggja næga fæðu og samræmi við gildisviðmiðanir. Við gegnumstreymisprófanir kemur önnur tilhögun til greina af tæknilegum ástæðum (t.d. fjórir hópar, hver með 10 dýrum í auknu prófunarrúmmáli) en gera skal grein fyrir öllum breytingum á tilhögun prófunar.

1.8.1.3. *Fjöldi dýra*

Við hálfkyrrstöðuprófanir skal nota a.m.k. 10 dýr, sem er haldið aðskildum, fyrir hvern prófunarstyrkleika og a.m.k. 10 dýr sem er haldið aðskildum í samanburðarröðunum.

Við gegnumstreymisprófanir hefur reynst hentugt (1. heimild) að nota 40 dýr, sem skipt er í fjóra hópa með 10 dýrum í hópi, fyrir hvern prófunarstyrkleika. Nota má færri prófunarlífverur og mælt er með að lágmarki 20 dýrum fyrir hvern styrkleika, skipt í tvö eða fleiri samhliða sýni með jöfnum fjölda dýra (t.d. fjögur samhliða sýni, hvert um sig með fimm halaflóm). Veita skal því athygli að í prófunum, þar sem dýrin eru haldin í hópum, verður ekki unnt að gefa viðkomuna upp sem heildarfjölda lifandi afkvæma, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, sem er á lífi í lok prófunarinnar ef undaneldisdýr drepast. Í þeim tilvikum skal gefa viðkomuna upp sem „heildarfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr, sem var á lífi í upphafi prófunar, gefur af sér“.

1.8.1.4. *Fóðrun*

Við hálfkyrrstöðuprófanir skal helst fóðra daglega og a.m.k. þrisvar í viku (þ.e. við skipti á miðlum). Greina skal frá frávikum frá þessu (t.d. í gegnumstreymisprófunum).

Fæða undaneldisdýranna í prófuninni skal helst vera einhver af eftirfarandi tegundum lifandi þörungafrumna, ein eða fleiri: Chlorella sp., Selenastrum capricornutum (nú Pseudokirchneriella subcapitata (11. heimild)) eða Scenedesmus subspicatus. Fæðan, sem er gefin, skal miðast við magn lífræns kolefnis (C) sem kemur í hlut hvers undaneldisdýrs. Rannsóknir (12. heimild) hafa sýnt að fyrir tegundina *Daphnia magna* nægir 0,1 til 0,2 mg skammtur af kolefni á hverja halafló á dag til að fá tilskilinn fjölda afkvæma til að uppfylla gildisviðmiðanir prófunarinnar. Skammtinn má gefa annaðhvort í jöfnu magni allan prófunartímann eða, ef vill, í minna magni í byrjun sem er síðan aukið í prófuninni til að taka tillit til vaxtar undaneldisdýranna. Í síðara tilvikinu skal skammturinn þó ávallt haldast innan ráðlagða bilsins sem er 0,1–0,2 kolefnis á hverja halafló á dag.

Ef nota á staðgöngumælingar, s.s. fjölda þörungafrumna eða ljósgleypni, til að fóðra með tilskildum skammti (þ.e. til hægðarauka því að mælingar á kolefnisinnihaldi eru tímafrekar), skal hver rannsóknarstofa búa til sitt eigið venslarit sem tengir staðgöngumælinguna við kolefnisinnihaldið í þörungaræktinni (sjá ráðleggingar um gerð venslarits í 2. viðbæti). Venslarit skulu prófuð a.m.k. árlega og oftar ef skilyrði í þörungarækt hafa breyst. Ljósgleypni hefur reynst betur til staðgöngumælingar á kolefnisinnihaldi en frumufjöldi (13. heimild).

Fóðra skal halaflærnar á óblandaðri þörungasviflausn til að rúmmál þörungaræktunarmiðils, sem er flutt yfir í prófunarílátin, verði sem minnst. Þörungalausnina má þykkja með skilvindu og síðan er lausnin enduruppleyst í eimuðu vatni, afjónuðu vatni eða ræktunarmiðli halaflónna.

1.8.1.5. *Lýsing*

Lýsing í 16 klukkustundir í styrk sem fer ekki yfir 15–20 μE m^{-2} s^{-1}.

1.8.1.6. *Hitastig*

Hitastig prófunarmiðilsins skal vera á bilinu 18–22 °C. Ef unnt er skal hitastigið í hverri einstakri prófun þó aldrei sveiflast meira en 2 °C innan þessara marka (t.d. 18–20, 19–21 eða 20–22 °C). Það getur verið heppilegt að nota viðbótarprófunarílát til að vakta hitastig.

1.8.1.7. *Loftun*

Ekki má lofta prófunarílátin meðan á prófuninni stendur.

1.8.2. **Prófunarstyrkleikar**

Alla jafna skulu vera a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar sem er raðað í jafnhlutfallaröð og æskilegt er að bilin milli þeirra greinist að með stuðli sem fer ekki yfir 3,2 og nota skal viðeigandi fjölda samhliða sýna fyrir hvern prófunarstyrk (sjá lið 1.8.1.3). Færa skal rök fyrir því ef færri en fimm styrkleikar eru notaðir. Efni skulu ekki prófuð við styrkleika sem er meiri en sem nemur leysnimörkum þeirra í prófunarmiðlinum.

Við ákvörðun á röð styrkbila skal hafa eftirfarandi í huga:

Ef markmiðið er að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif/ styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif verður minnsti prófunarstyrkurinn að vera svo lítill að frjósemi við þann styrk sé ekki marktækt minni en í samanburðarhópnum. Ef þetta næst ekki verður að endurtaka prófunina og minnka minnsta styrkleikann.

Ef markmiðið er að ákvarða minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif verður hæsti prófunarstyrkurinn að vera nógu hár til að frjósemi við þann styrkleika sé marktækt minni en í samanburðarhópnum. Ef þetta næst ekki verður að endurtaka prófunina og auka mesta styrkleikann.

Ef EC_x fyrir áhrif á æxlun er áætlað er ráðlegt að nota nægan styrkleika til að skilgreina EC_x með viðeigandi öryggismörkum. Ef EC_{50} fyrir áhrif á æxlun er áætlað er ráðlegt að hæsti prófunarstyrkurinn sé hærri en þetta EC_{50}. Að öðrum kosti verður öryggisbilið fyrir EC_{50} mjög vítt, þó enn verði mögulegt að áætla EC_{50}, og ef til vill verður ekki unnt að meta hversu vel líkanið passar.

Í röð prófunarstyrkleika ættu helst ekki að vera styrkleikar sem hafa tölfræðilega marktæk áhrif á lifun fullvaxinna halaflóa þar eð það myndi breyta eðli prófunarinnar úr einfaldri æxlunarprófun í sameinaða æxlunar og dauðsfallaprófun sem útheimtir mun flóknari tölfræðilega greiningu.

Fyrirliggjandi þekking á eiturhrifum prófunarefnisins (t.d. úr rannsóknum á bráðum eiturhrifum og/eða skammtastærðarannsóknum) ætti að koma að gagni við val á hæfilegum prófunarstyrkleika.

Ef leysir eða dreifiefni er notað sem hjálparefni þegar prófunarlausn er útbúin (sjá lið 1.6.4) skal lokastyrkur þess í prófunarílátinu ekki vera meiri en 0,1 ml/l og hann skal vera sá sami í öllum prófunarílátunum.

1.8.3. **Samanburður**

Keyra skal eina samanburðarröð með prófunarmiðlinum og einnig, ef við á, eina samanburðarröð með leysinum eða dreifiefninu til viðbótar við prófunarröðina. Ef notaður er leysir eða dreifiefni skal styrkleikinn vera sá sami og er notaður í ílátunum með prófunarefninu. Nota skal viðeigandi fjölda samhliða sýna (sjá lið 1.8.1.3).

Í vel útfærðum prófunum á fráviksstuðull frá meðalfjölda lifandi afkvæma sem hvert undaneldisdýr getur af sér í samanburðarprófun(um) að jafnaði að vera ≤ 25% og skal gera grein fyrir þessu ef tilhögun prófunar er þannig að dýrunum er haldið aðskildum.

1.8.4. **Endurnýjun prófunarmiðils**

Hversu oft miðillinn er endurnýjaður ræðst af stöðugleika prófunarefnisins en þó skal hann endurnýjaður a.m.k. þrisvar í viku. Ef áður gerðar forprófanir á stöðugleika (sjá lið 1.4) hafa leitt í ljós að styrkur prófunarefnisins er ekki stöðugur (þ.e. utan bilsins 80–120% af nafnstyrk eða fellur undir 80% af mældum upphafsstyrk) á hámarkstíma til endurnýjunar (þ.e. þrír dagar) skal vega það og meta hvort endurnýja skuli miðilinn oftar eða nota gegnumstreymisprófun.

Þegar miðillinn er endurnýjaður í hálfkyrrstöðuprófunum er útbúin önnur röð prófunaríláta og undaneldisdýrin færð yfir í þau, t.d. með glerpípettu með hæfilegu þvermáli. Rúmmál miðilsins, sem er fært á milli með halaflónum, skal vera í lágmarki.

1.8.5. **Athuganir**

Niðurstöður athugana, sem gerðar eru meðan á prófun stendur, skulu skráðar á gagnablöð (sjá dæmi í 3. og 4. viðbæti). Sé annarra mælinga krafist (sjá liði 1.3 og 1.8.8) kann að vera þörf á frekari athugunum.

1.8.6. **Afkvæmi**

Afkvæmin, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, skulu helst fjarlægð og talin daglega frá því að fyrstu afkvæmi koma fram til að koma í veg fyrir að þau éti fæðuna sem ætluð er fullvöxnu halaflónni. Þegar þessi aðferð er notuð þarf aðeins að telja fjölda lifandi afkvæma en skrá skal öll egg, sem ekki klekjast út, og dauð afkvæmi sem eru til staðar.

1.8.7. **Dánartíðni**

Dánartíðni hjá undaneldisdýrum skulu helst skráð daglega og a.m.k. á sömu tímum og afkvæmin eru talin.

1.8.8. **Aðrir mæliþættir**

Þó að þessi aðferð sé fyrst og fremst ætluð til að meta áhrif á æxlun er hugsanlegt að önnur áhrif komi svo vel í ljós að hægt sé að gera tölfræðilega greiningu. Vaxtarmælingar eru mjög æskilegar þar eð þær veita upplýsingar um möguleg nær banvæn áhrif, sem geta verið gagnlegri en mælingar á æxlun eingöngu; mælt er með mælingum á lengd undaneldisdýranna (þ.e. lengd bols að frátöldum halanum) við lok prófunarinnar. Aðrir mæliþættir, sem hægt er að mæla eða reikna, eru m.a. tíminn fram að fyrstu afkvæmum (og síðari afkvæmum), fjöldi og stærð afkvæma hjá hverri halafló, fjöldi afkvæma sem klekjast ekki út, hvort karldýr eða söðulhýði eru fyrir hendi og vaxtarhraði stofnsins.

1.8.9. **Tíðni magngreininga og mælinga**

Mæla skal súrefnisstyrk, hitastig, hörku og sýrustig a.m.k. einu sinni í viku í nýjum og gömlum miðlum, í samanburðarröðinni eða röðunum og í mesta styrk prófunarefnisins.

Í prófuninni er styrkleiki prófunarefnisins ákvarðaður með reglulegu millibili.

Í hálfkyrrstöðuprófunum þar sem þess er vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk (þ.e. innan bilsins 80–120%; sjá liði 1.4 og 1.8.4) er mælt með því að greina a.m.k. hæsta og lægsta prófunarstyrkleika þegar lausn er nýtilreidd og einu sinni við endurnýjun í fyrstu prófunarviku (þ.e. gera skal greiningu á sýni úr sömu lausninni — þegar hún er nýtilreidd og við endurnýjun). Þessar ákvarðanir skulu endurteknar a.m.k. vikulega eftir það.

Í prófunum þar sem þess er ekki vænst að styrkur prófunarefnis haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk er nauðsynlegt að greina alla prófunarstyrkleika þegar lausnir eru nýtilreiddar og við endurnýjun. Í prófunum, þar sem mældur upphafsstyrkur prófunaríðefnis liggur utan markanna ± 20% af nafnstyrk en sýna má fram á endurtekningarnákvæmni og stöðugleika upphaflegs styrkleika (þ.e. innan markanna 80–120% af upphaflegum styrkleika), er hins vegar hægt að fækka efnafræðilegum mælingum í 2. og 3. prófunarviku og ekki mæla nema hæsta og lægsta prófunarstyrk . Í öllum tilvikum þarf ákvörðun á styrkleikum prófunarefnis fyrir endurnýjun aðeins að fara fram í einu samhliða prófunaríláti fyrir hvern prófunarstyrk.

Ef um er að ræða gegnumstreymisprófanir hentar að nota svipaða sýnatökuáætlun og lýst er fyrir hálfkyrrstöðuprófanir (en mælingar á „gömlum“ lausnum eiga ekki við í þessu tilviki). Þó getur verið ráðlegt að auka fjölda þeirra skipta þar sem sýni eru tekin í fyrstu vikunni (t.d. þrennar mælingar) til að tryggja að prófunarstyrkur haldist stöðugur. Í prófunum af þessari tegund skal athuga streymi þynningarefnis og prófunarefnis daglega.

Ef unnt er að sýna fram á að styrkur efnis, sem verið er að prófa, hafi örugglega haldist innan markanna ± 20% af nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk í allri prófuninni er heimilt að niðurstöðurnar grundvallist hvort sem er á nafngildi eða mældu upphafsgildi. Ef frávik frá nafnstyrk eða mældum upphafsstyrk er utan markanna ± 20% skal gefa niðurstöðurnar upp sem tímavegið meðaltal (sjá 5. viðbæti).

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Markmiðið með þessari prófun er að ákvarða áhrif prófunarefnisins á heildarfjölda lifandi afkvæma, sem hvert undaneldisdýr getur af sér, sem er á lífi í lok prófunarinnar. Reikna skal heildarfjölda afkvæma á hvert undaneldisdýr fyrir hvert prófunarílát (þ.e. samhliða sýni). Ef undaneldisdýr drepst í samhliða sýni í prófuninni eða í ljós kemur að það er karlkyns er það samhliða sýni útilokað úr greiningunni. Greiningin byggist þá á færri samhliða sýnum.

Til að mæla minnsta styrk, sem hefur merkjanleg áhrif, og þar með styrk, sem hefur engin merkjanleg áhrif, að því er varðar áhrif íðefnisins á viðkomu, er nauðsynlegt að reikna meðalviðkomu í öllum samhliða sýnum fyrir hvern styrkleika og samanlagt staðalfrávik leifa en þetta er að hægt að gera með dreifnigreiningu (ANOVA). Meðaltalið fyrir hvern styrkleika skal svo borið saman við meðaltal samanburðarins með viðeigandi aðferð þar sem notaður er margfaldur samanburður. Prófanir samkvæmt Dunnett eða Williams geta komið að gagni (14.–17. heimild). Nauðsynlegt er að kanna hvort forsenda dreifnigreiningar um einsleitni dreifninnar stenst. Mælt er með því að þetta sé gert með myndrænum aðferðum fremur en með formlegri marktækniprófun (18. heimild); annar, viðeigandi valkostur er að gera Bartlettsprófun. Ef þessi forsenda stenst ekki skal vega það og meta að breyta gögnunum til að gera dreifni einsleita áður en dreifnigreining er gerð eða til að framkvæma vegna dreifnigreiningu. Reikna skal umfang þeirra áhrifa, sem unnt er að greina með dreifnigreiningu (þ.e. minnsti marktæki munur) og gera grein fyrir því.

Til að meta styrkinn, sem veldur 50% minnkun viðkomu (þ.e. EC_{50}), skal laga viðeigandi feril, s.s. umhverfðan veldisvísisferil, að gögnunum með því að beita tölfræðilegri aðferð, s.s. aðferð minnstu kvaðrata. Hægt er að stika ferillinn þannig að hægt sé að meta EC_{50} og staðalskekkju þess beint. Þetta myndi auðvelda til muna útreikning á öryggismörkum fyrir EC_{50}. Ef ekki eru gild rök fyrir því að kjósa fremur mismunandi öryggismörk skal gefa upp tvíhliða 95% öryggismörk. Aðlögunaraðferðin skal helst gera kleift að meta marktækni þess þegar samræmi skortir. Þetta má gera með myndrænum aðferðum eða með því að skipta summum kvaðratsleifa í „samræmi skortir“ og „hreinir skekkjuþættir“ og gera tölfræðilegt próf á því þegar samræmi skortir. Þar eð líklegt er að breytileiki í fjölda ungviðis, sem fæst með meðferð sem veldur mikilli frjósemi, verði meiri en við meðferð sem veldur lítilli frjósemi skal huga að því að vega mæld gildi til að endurspegla mismunandi breytileika í mismunandi meðferðarhópum (sjá bakgrunnsupplýsingar í 18. heimild).

Í greiningu á gögnum úr lokahringprófuninni (2. heimild) var umhverfður veldisvísisferill lagaður að gögnunum með því að nota eftirfarandi líkan, þó að einnig megi nota önnur hentug líkön:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

þar sem:

Y = heildarfjöldi ungviðis á hvert undaneldisdýr sem er á lífi í lok prófunarinnar (reiknað fyrir hvert ílát)

x = styrkur efnisins

c = sá fjöldi ungviðis sem búist er við þegar x = 0

X_0 = EC_{50} fyrir þýðið

b = hallatalan.

Líklegt er að þetta líkan sé viðunandi í mjög mörgum tilvikum þótt það henti ekki fyrir allar prófanir. Kanna skal gildi líkansins eins og lagt er til hér að framan. Í sumum tilvikum kann að henta að nota tvífasalíkan þar sem lítill styrkleiki gefur aukin áhrif (19. heimild).

Einnig má meta annan hrifstyrk, s.s. EC_{10} eða EC_{20}, þó að það geti verið betra að nota aðra stikun líkansins en notuð er til að meta EC_{50}.

2.2. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. **Prófunarefni:**

— eðlisástand og viðeigandi, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, þ.m.t. hreinleiki.

2.2.2. **Prófunartegund:**

— klónið (hvort arfgerð þess hafi verið greind), birgir eða uppruni (ef þekkt) og skilyrði við ræktun. Ef notuð er önnur tegund en *Daphnia magna* skal greina frá því og rökstyðja það.

2.2.3. **Prófunarskilyrði:**

— prófunaraðferð sem er notuð (t.d. hálfkyrrstöðuprófun eða gegnumstreymisprófun, rúmmál, hleðsla sem fjöldi halaflóa á lítra),

— ljóslota og ljósstyrkur,

— tilhögun prófunar (t.d. fjöldi samhliða prófana, fjöldi undaneldisdýra á hverja samhliða prófun),

— upplýsingar um ræktunarmiðilinn sem er notaður,

— ef lífrænu efni er bætt við skal tilgreina samsetningu, uppruna, aðferð við tilreiðslu, heildarmagn lífræns kolefnis/efnafræðilega súrefnisþörf stofnlausna og mat á heildarmagni lífræns kolefnis/efnafræðilegri súrefnisþörf í prófunarmiðlinum sem þar af leiðir,

— ítarlegar upplýsingar um fóðrun, þ.m.t. magn (í mg kolefnis á halafló á dag) og áætlun (t.d. tegund(ir) fóðurs, þ.m.t., ef um er að ræða þörunga, sérheiti (tegund) og stofn ef hann er þekktur, og ræktunarskilyrði),

— aðferð við tilreiðslu stofnlausna og hve oft endurnýjun á sér stað (tilgreina skal leysi eða dreifiefni og styrk þeirra ef þau eru notuð).

2.2.4. **Niðurstöður:**

— niðurstöður úr öllum forrannsóknum á stöðugleika prófunarefnisins,

— nafnstyrkleikar í prófuninni og niðurstöður úr öllum greiningum til að ákvarða styrk prófunarefnisins í prófunarílátunum (sjá dæmi um gagnablöð í 4. viðbæti); einnig skal greina frá endurheimtargetu aðferðarinnar og magngreiningarmörkum,

— gæði vatns í prófunarílátum (þ.e. sýrustig, hitastig og styrkur uppleysts súrefnis, heildarmagn lífræns kolefnis og/eða efnafræðileg súrefnisþörf og harka, eftir atvikum) (sjá dæmi um gagnablað í 3. viðbæti),

— tæmandi skrá yfir lifandi afkvæmi fyrir hvert undaneldisdýr (sjá dæmi um gagnablað í 3. viðbæti),

— fjöldi dauðra undaneldisdýra og dánardagur (sjá dæmi um gagnablað í 3. viðbæti),

— fráviksstuðull fyrir frjósemi samanburðarhóps (byggt á heildarfjölda lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr sem er á lífi í lok prófunar),

— ferill yfir fjölda lifandi afkvæma á hvert undaneldisdýr (fyrir hverja samhliða prófun), sem er á lífi í lok prófunar, á móti styrk prófunarefnis,

— minnsti styrkur sem hefur merkjanleg áhrif á æxlun, þ.m.t. lýsing á þeim tölfræðilegu aðferðum sem eru notaðar og ábending um stærð áhrifanna sem unnt var að greina, og styrkur sem hefur engin merkjanleg áhrif á æxlun og einnig skal, eftir atvikum, greina frá minnsta styrk sem hefur merkjanleg áhrif/styrk sem hefur engin merkjanleg áhrif á dánarhlutfall hjá undaneldisdýrunum,

— EC_X fyrir æxlun og öryggisbil og línurit af aðlagaða líkaninu, sem er notað við þá útreikninga, hallatölu skammtasvörunarferils og staðalskekkju hans, eftir því sem við á,

— önnur líffræðileg áhrif sem komu fram eða mælingar: greinið frá öllum öðrum líffræðilegum áhrifum, sem komu fram eða voru mæld (t.d. vexti undaneldisdýra) ásamt viðeigandi rökstuðningi,

— útskýring á hvers kyns fráviki frá prófunaraðferðinni.

3. **HEIMILDIR**

1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the Daphnia magna Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20- 21 March 1993.

2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No6. Report of the Final Ring Test of the Daphnia magna Reproduction Test Paris. 1997.

3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991) A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of Daphnia magna Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, bls. 257-265.

4) Elendt B.P., (1990) Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, bls. 25-33.

5) EPA (1993) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, bls. 775-782.

7) ASTM (1988) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. bls. 20.

8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P., (1989) The long term maintenance of Daphnia magna Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. Í: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) bls. 144-148.

9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P., (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with Daphnia magna. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, bls. 1-8.

10) Cowgill U.M. and Milazzo D.P., (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120(2), bls. 185-196.

11) Korshikov (1990) Pseudokirchneriella subcapitata Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, bls. 209.

12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D., (1993) Toward a standard Daphnia juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, bls. 2053-2058.

13) Sims I., (1993) Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

14) Dunnett C.W., (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, bls. 1096-1121.

15) Dunnett C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, bls. 482-491.

16) Williams D.A., (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, bls. 103-117.

17) Williams D.A., (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, bls. 510-531.

18) Draper N.R. and Smith H., (1981) Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

19) Brain P. and Cousens R., (1989) An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, bls. 93-96.

20) Wilson E.O. and Bossert, W.H., (1971) A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

21) Poole R.W., (1974) An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, bls. 532.

22) Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L. and Boyce M.S., (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, bls. 1156-1166.

1. viðbætir

TILREIÐSLA FULLSKILGREINDU MIÐLANNA ELENDT M7 OG M4

Aðlögun að miðlunum Elendt M7 og M4

Á sumum rannsóknarstofum hefur reynst erfitt að flytja halaflær beint yfir í miðlana M4 (1. heimild) og M7. Nokkur árangur hefur hins vegar náðst með hægfara aðlögun, þ.e. að flytja halaflærnar úr sínum eigin miðli yfir í 30% Elendt, því næst yfir í 60% Elendt og að lokum yfir í 100% Elendt. Aðlögunartíminn getur þurft að taka allt að einum mánuði.

TILREIÐSLA

Snefilefni

Aðskildar stofnlausnir (I) einstakra snefilefna eru fyrst tilreiddar í vatni af viðeigandi hreinleika, t.d. afjónuðu, eimuðu eða þrýstisíuðu yfir himnu. Úr þessum mismunandi stofnlausnum (I) er tilreidd önnur stök stofnlausn (II) sem inniheldur öll snefilefnin (samsett lausn), þ.e.:

Stofnlausnir I (stakt efni)	Magn sem bætt er í vatn mg/l	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4) sinnum	Til að tilreiða sameinaða stofnlausn II skal bæta eftirfarandi magni af stofnlausn I í vatn ml/l	
			M 4	M 7
H_3BO_3	57190	20000	1,0	0,25
$MnCl_2 * 4 H_2O$	7210	20000	1,0	0,25
LiCl	6120	20000	1,0	0,25
RbCl	1420	20000	1,0	0,25
$SrCl_2 * 6 H_2O$	3040	20000	1,0	0,25
NaBr	320	20000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 * 2 H_2O$	1260	20000	1,0	0,25
$CuCl_2 * 2 H_2O$	335	20000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20000	1,0	1,0
$CoCl_2 * 6 H_2O$	200	20000	1,0	1,0
KI	65	20000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20000	1,0	1,0
$Na_2EDTA * 2 H_2O$	5000	2000	—	—
$FeSO_4 * 7 H_2O$	1991	2000	—	—

Lausnirnar Na_2EDTA og $FeSO_4$ eru tilreiddar hvor fyrir sig, þeim hellt saman og þær gufusæfðar þegar í stað. Það gefur:

21 Fe-EDTA-lausn		1000-falda	20,0	5,0

Miðlarnir M4 og M7

Miðlarnir M4 og M7 eru tilreiddir með stofnlausn II, helstu næringarefnum og vítamínum sem hér segir:

	Magn sem bætt er í vatn mg/l	Styrkur (í hlutfalli við miðil M4) sinnum	Magn stofnlausnar sem bætt er við til að útbúa miðil ml/l	
			M 4	M 7
Stofnlausn II (sameinuð snefilefni)		20	50	50
Stofnlausnir með helstu næringarefnum (stakt efni)				
$CaCl_2 * 2 H_2O$	293800	1000	1,0	1,0
$MgSO_4 * 7 H_2O$	246600	2000	0,5	0,5
KCl	58000	10000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64800	1000	1,0	1,0
$Na_2SiO_3 * 9 H_2O$	50000	5000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2740	10000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1430	10000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1840	10000	0,1	0,1
Sameinuð vítamínstofnlausn	—	10000	0,1	0,1
Sameinaða vítamínstofnlausnin er tilreidd með því að bæta vítamínunum þremur í 1 lítra af vatni sem hér segir:				
Þíamínvetnisklóríð	750	10000	—	—
Sýanókóbalamín (B_{12})	10	10000	—	—
Bíótín	7,5	10000	—	—

Samsetta vítamínstofnlausnin er geymd frosin í litlum deiliskömmtum. Vítamínunum er bætt við miðilinn skömmu fyrir notkun.

Ath. Til að koma í veg fyrir að sölt falli út við tilreiðslu sameinaðs miðils skal bæta deiliskömmtum stofnlausnar út í u.þ.b. 500–800 ml af afjónuðu vatni og fylla síðan upp í 1 lítra.

Ath. einnig. Fyrstu birtu upplýsingar um miðilinn M4 voru birtar í Elendt, B.P. (1990): Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, bls. 25-33.

2. viðbætir

GREINING Á HEILDARMAGNI LÍFRÆNS KOLEFNIS OG GERÐ VENSLARITS FYRIR HEILDARMAGN LÍFRÆNS KOLEFNIS Í ÞÖRUNGAFÓÐRI

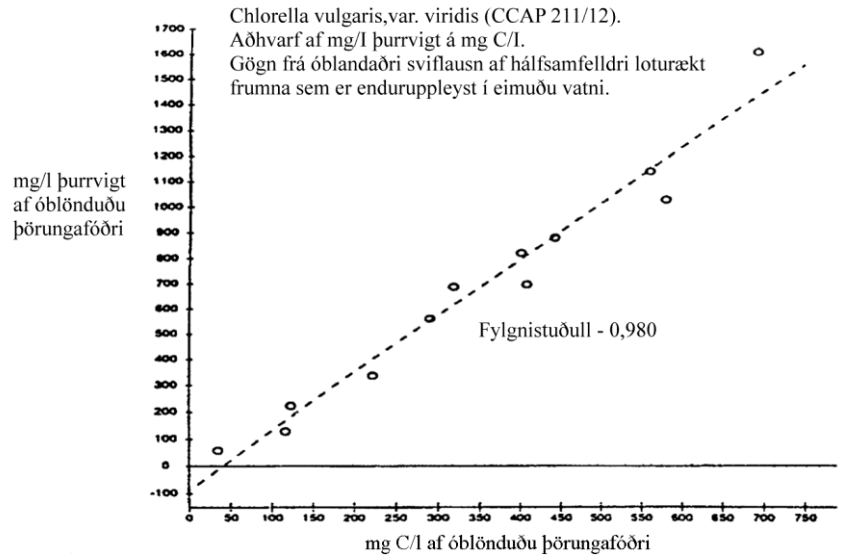
Það skal viðurkennt að kolefnisinnihald þörungafóðurs er yfirleitt ekki mælt beint heldur út frá fylgni (þ.e. venslaritum) með staðgöngumælingum, s.s. fjölda þörungafrumna eða ljósgleypni.

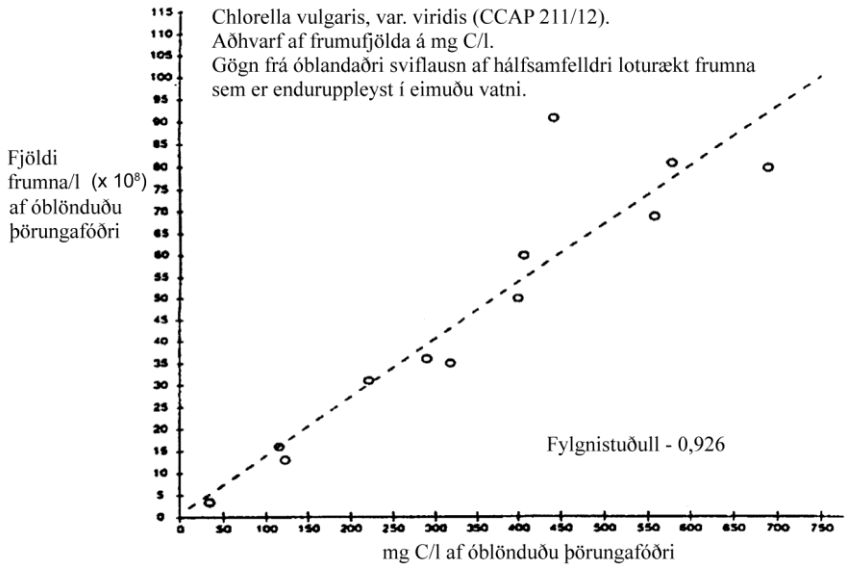
Heildarmagn lífræns kolefnis skal mælt með oxun við háan hita fremur en með aðferðum með útfjólubláu ljósi eða persúlfati. (Sjá: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

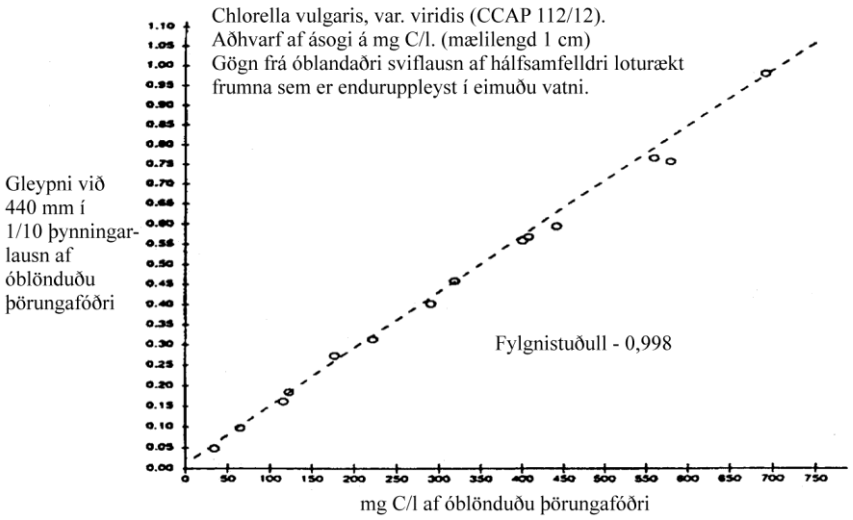
Við gerð venslarits skal skilja þörungana frá vaxtarmiðlinum í skilvindu og síðan er lausnin endurupplеyst í eimuðu vatni. Mæla skal staðgöngumæliþáttinn og heildarstyrk lífræns kolefnis í hverju sýni þrisvar. Greina skal núllsýni með eimuðu vatni og leiða heildarstyrk lífræns kolefnis út frá heildarstyrk lífræns kolefnis í þörungasýninu.

Venslarit skulu vera línuleg yfir tilskilið styrksvið kolefnis. Dæmi fylgja hér á eftir.

Ath.: Þau ætti ekki að nota fyrir umreikninga; mikilvægt er að rannsóknarstofur útbúi sín eigin venslarit.






Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12).
Aðhvarf af ásogi á mg C/l. (mælilengd 1 cm)
Gögn frá óblandaðri sviflausn af hálfsamfelldri loturækt frumna sem er endurupplevst í eimuðu vatni.
Gleypni við 440 mm í 1/10 þynningar-lausn af óblönduðu þörungafóðri
Fylgnistuðull - 0,998
mg C/l af óblönduðu þörungafóðri

3. viðbætir

DÆMI UM GAGNABLAÐ ÞAR SEM ENDURNÝJUN MIÐILS, EÐLISFRÆÐILEG/EFNAFRÆÐILEG VÖKTUNARGÖGN, FÓÐRUN, ÆXLUN HALAFLÓA OG DÁNARHLUTFALL FULLVAXINNA HALAFLÓA ER SKRÁÐ

Tilraun nr.: Upphafsdagsetning: Klón: Miðill: Tegund fóðurs: Prófunarefni: Nafnstyrkur:

Dagur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Miðlungs endurnýjun (merkið við)																								
PH (1)																							nýr	
																							gamall	
O2 mg/l (1)																							nýr	
																							gamall	
Hitastig (°C) (1)																							nýr	
																							gamall	
Fóður sem er gefið (merkið við)																								
Ekkert lifandi afkvæmi (2)																								Samtals
Ílát 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								

Tilraun nr.:		Upphafsdagsetning:				Klón:			Miðill:				Tegund fóðurs:				Prófunarefni:					Nafnstyrkur:		
Dagur	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
9																								
10																								
																							Samtals	
Uppsöfnuð afföll hjá fullvöxnum halaflóm (3)																								

(1) Tilgreinið hvaða ílát var notað í tilrauninni.

(2) Skráið öll dauðsföll hjá fullorðnum halaflóm sem „M“ í viðeigandi reit.

(3) Skráið egg, sem klöktust ekki út, sem „AB“ í viðeigandi reit.

4. viðbætir

DÆMI UM GAGNABLAÐ TIL AÐ SKRÁ NIÐURSTÖÐUR ÚR EFNAGREININGUM

a) **Mældir styrkleikar**

Nafnstyrkur	Sýni í 1. viku		Sýni í 2. viku		Sýni í 3. viku	
	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt

b) **Mældir styrkleikar sem hundraðshluti af nafnstyrk**

Nafnstyrkur	Sýni í 1. viku		Sýni í 2. viku		Sýni í 3. viku	
	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt	Nýtt	Gamalt

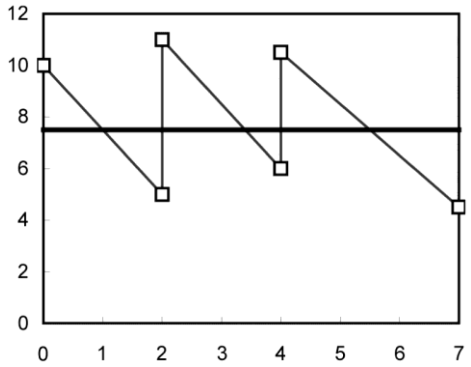
5. viðbætir

ÚTREIKNINGUR Á TÍMAVEGNU MEÐALTALI

Tímavegið meðaltal

Þar eð styrkur prófunarefnis getur minnkað á þeim tíma sem líður milli þess að miðill er endurnýjaður er nauðsynlegt að vega og meta hvaða styrkur skuli valinn sem dæmigerður fyrir þá röð styrkbila sem undaneldisdýr halaflónna komast í snertingu við. Valið skal byggjast á líffræðilegum forsendum sem og tölfræðilegum. Sé t.d. álitið að æxlun verði fyrir mestum áhrifum af toppgildi styrks sem fæst skal nota hámarksstyrk. Sé hins vegar talið að uppsöfnuð áhrif eiturefnisins eða áhrif þess til lengri tíma séu veigameiri skiptir meðalstyrkurinn meira máli. Í því tilviki er tímaveginn meðalstyrkur sá meðalstyrkur sem viðeigandi er að nota þar eð hann miðast við breytingar á augnablikksstyrk með tímanum.

Mynd 1: Dæmi um tímavegið meðaltal



Á mynd 1 er dæmi um (einfaldaða) prófun sem varir í sjö daga og miðillinn er endurnýjaður á degi 0, 2 og 4.

— Línan, sem sveiflast upp og niður, sýnir styrkinn á hverjum tíma. Gert er ráð fyrir að minnkun styrksins fylgi ferli veldisvísishrörnunar.

— Teiknuðu punktarnir sex eru mældir styrkleikar við upphaf og lok hvers endurnýjunartímabils.

— Lárétta línan sýnir stöðu tímavegins meðaltals.

Tímavegið meðaltal er reiknað þannig að svæðið undir tímavegna meðaltalinu er jafnt svæðinu undir styrkferlinum. Útreikningar á framangreindu dæmi eru raktir í töflu 1.

Tafla 1:

Útreikningur á tímavegnu meðaltali

Nr. endurnýjunar	Dagar	Styrkur 0	Styrkur 1	Ln (styrkur 0)	Ln (styrkur 1)	Svæði
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781

Nr. endurnýjunar	Dagar	Styrkur 0	Styrkur 1	Ln (styrkur 0)	Ln (styrkur 1)	Svæði
Dagar alls: 7					Heildarsvæði	50,091
					Tímavegið meðaltal	7,156

„*Dagar*“ eru fjöldi daga á endurnýjunartímabilinu
„*Styrkur 0*“ er mældur styrkur í upphafi hvers endurnýjunartímabils
„*Styrkur 1*“ er mældur styrkur í lok hvers endurnýjunartímabils
„*Ln (styrkur 0)*“ er náttúrulegur logri styrks 0
„*Ln (styrkur 1)*“ er náttúrulegur logri styrks 1
„*Svæði*“ er svæðið undir veldisvísisferli hvers endurnýjunartímabils. Það er reiknað á eftirfarandi hátt:

$$Svæði = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0 - Ln(Conc1)} \times Dagar$$

Tímavegið meðaltal er heildarsvæðið deilt með heildarfjölda daga; taflan þarf að sjálfsögðu að ná yfir 21. dag þegar um er að ræða prófun á æxlun halaflóa.

Þegar athuganir eru aðeins gerðar í upphafi og lok hvers endurnýjunartímabils er ljóst að ekki er unnt að staðfesta að hrörnunarferlið sé í raun veldisvísisfall. Öðruvísi ferill gæfi annan útreikning á gildinu fyrir „Svæði“. Veldisvísishrörnun er þó ekki ósennileg og er líklega sá ferill sem er best að nota ef aðrar upplýsingar liggja ekki fyrir.

Þó þarf að sýna ítrustu gætni ef ekki tekst með efnagreiningu að finna neitt efni í lok endurnýjunartímabilsins. Ómögulegt er að finna raunhæft svæði undir ferlinum nema unnt sé að meta hversu hratt efnið hverfur úr lausninni og þar af leiðandi er ógerlegt að fá fram raunhæft, tímavegið meðaltal.

———

C.21. **ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á KÖFNUNAREFNISUMMYNDUN**

1. **AÐFERÐ**

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 216 um prófanir (2000).

1.1. INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til rannsóknar á því hvaða langtímaáhrif það getur haft á köfnunarefnisummyndun örvera í jarðvegi ef þær verða fyrir váhrifum af íðefni einu sinni. Prófunin byggist mestmegnis á leiðbeiningum Samtaka um plöntuvernd í Evrópu og á Miðjarðarhafssvæðinu (1. heimild). Þó var einnig tekið tillit til annarra leiðbeininga, þ.m.t. leiðbeininga frá Biologische Bundesanstalt í Þýskalandi (2. heimild), Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (3. heimild), SETAC (4. heimild) og Alþjóðastaðlasamtökunum (ISO) (5. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgirate á Ítalíu árið 1995 (6. heimild), var gerð samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hversu margar skyldi nota í þessari prófun. Ráðleggingar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna eru byggðar á leiðbeiningaskjali ISO (7. heimild) og ráðleggingum frá vinnufundinum í Belgirate. Við mat og úttekt á eitureigineikum prófunarefna getur reynst nauðsynlegt að ákvarða áhrif á virkni örvera í jarðvegi, t.d þegar þörf er á gögnum um hugsanlegar aukaverkanir plöntuverndarvara á örflóru í jarðvegi eða þegar þess er vænst að örverur í jarðvegi verði fyrir váhrifum af öðrum íðefnum en plöntuverndarvörum. Prófun á köfnunarefnisummyndun er gerð til að ákvarða áhrif slíkra íðefna á örflóru í jarðvegi. Ef gerð er prófun á íðefnum í landbúnaði (t.d. plöntuverndarvörum, áburði, íðefnum í skógrækt) eru gerðar prófanir á bæði köfnunarefnis- og kolefnisummyndun. Ef um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði nægir prófun á köfnunarefnisummyndun. Ef slík íðefni eru prófuð m.t.t. köfnunarefnisummyndunar og EC_{50}-gildi eru á því bili sem þekkist fyrir nítrunarlata, sem fást á almennum markaði (t.d. nítrapýrín), má þó afla frekari upplýsinga með því að gera prófun á kolefnisummyndun.

Jarðvegur er gerður úr lífrænum og ólífrænum þáttum sem koma fyrir í flóknum og sundurleitum samsetningum. Örverur gegna mikilvægu hlutverki í niðurbroti og ummyndun lífræns efnis í frjósömum jarðvegi og margar tegundir hafa áhrif á ólíka þætti í frjósemi jarðvegsins. Langvarandi röskun á þessum lífefnafræðilegu ferlum gæti hugsanlega raskað hringrás næringarefna sem getur breytt frjósemi jarðvegsins. Ummyndun á kolefni og köfnunarefni á sér stað í öllum frjósömum jarðvegi. Þótt örverusamfélögin, sem valda þessum ferlum, séu breytileg eftir jarðvegsgerðum eru ummyndunarferlin í meginatriðum þau sömu.

Prófunaraðferðinni, sem hér er lýst, er ætlað að greina skaðleg langtímaáhrif efnis á ferli köfnunarefnisummyndunar í yfirborðsjarðvegi við loftháðar aðstæður. Prófunaraðferðin gerir það einnig kleift að meta áhrif efna á kolefnisummyndun af völdum örflóru jarðvegsins. Myndun nítrats á sér stað eftir að efnatengi kolefnis og köfnunarefnis rofna. Ef nítratframleiðsla er jafnmikil í meðhöndluðum jarðvegi og samanburðarjarðvegi er því mjög líklegt að helstu niðurbrotsferli kolefnis séu ósködduð og starfandi. Ætið, sem er valið fyrir prófunina (refasmáramjöl), hefur ákjósanlegt kolefnis-/köfnunarefnishlutfall (vanalega á bilinu 12/1 og 16/1). Út af þessu dregur úr kolefnissvelti meðan á prófun stendur og ef örverusamfélögin skaddast af völdum íðefnis gætu þau náð sér innan 100 daga.

Prófanirnar, sem þessi prófunaraðferð byggist á, voru upphaflega hannaðar fyrir efni þar sem hægt er að gera ráð fyrir magninu sem berst í jarðveginn. Þetta á t.d. við um plöntuverndarvörur þar sem vitað er hversu miklu hefur verið dreift á viðkomandi land. Þegar um er að ræða íðefni í landbúnaði nægir að prófa tvo skammta sem eru hæfilegir með tilliti til þess magns sem ráðgert er eða áætlað að nota. Prófa má íðefni í landbúnaði sem virk innihaldsefni eða sem samsettar vörur. Prófunin er þó ekki bundin við íðefni í landbúnaði. Með því að breyta bæði magni prófunarefnisins, sem er sett í jarðveginn, og því hvernig gögnin eru metin má einnig nota prófunina fyrir íðefni þar sem ekki er vitað hversu mikið magn má búast við að berist í jarðveginn. Á þann hátt eru áhrifin af röð styrkleika á köfnunarefnisummyndun ákvörðuð þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði. Gögnin úr þessum prófunum eru notuð til að draga upp skammtasvörunarferil og reikna út EC_x-gildi þar sem x er skilgreindur hundraðshluti áhrifa.

1.2. SKILGREININGAR

Köfnunarefnisummyndun: endanlegt niðurbrot af völdum örvera á lífrænu efni sem inniheldur köfnunarefni, sem á sér stað með ferlum ammoníaksmyndunar og nítrunar, yfir í samsvarandi, ólífræna lokaafurð, nítrat.

EC_x (hrifstyrkur): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun köfnunarefnis yfir í nítrat sem nemur x hundraðshlutum.

EC_{50} (miðgildi hrifstyrks): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun köfnunarefnis yfir í nítrat sem nemur 50 hundraðshlutum (50%).

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Plöntumjöli í duftformi er bætt í sigtaðan jarðveg sem er annaðhvort meðhöndlaður með prófunarefninu eða látinn óhreyfður (samanburður). Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er mælt með a.m.k. tvenns konar prófunarstyrkleika sem velja skal með hliðsjón af mesta styrk sem gert er ráð fyrir á staðnum. Eftir 0, 7, 14 og 28 daga ræktun eru sýni úr meðhöndluðum jarðvegi og samanburðarjarðvegi dregin út með viðeigandi leysi og nítratmagnið í útdrættinum ákvarðað. Hlutfall nítratmyndunar í meðhöndluðum sýnum er borið saman við hlutfallið í samanburðinum og hlutfallslegt frávik meðhöndlaðra sýna miðað við samanburð reiknað út. Allar prófanir standa yfir í a.m.k. 28 daga. Ef munurinn milli meðhöndlaðs jarðvegs og samanburðarjarðvegs er 25% eða meiri á 28. degi er mælingum haldið áfram í að hámarki 100 daga. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er röð styrkleika af prófunarefni bætt í jarðvegssýni og nítratmagn, sem myndast í meðhöndluðum sýnum og samanburðarsýnum, mælt eftir 28 daga ræktun. Niðurstöður úr prófunum með mismunandi styrkleikum eru greindar og notað aðhvarfslíkan og EC_x-gildin reiknuð út (t.d. EC_{50}, EC_{25} og/eða EC_{10}). Sjá skilgreiningar.

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Mat á niðurstöðum úr prófunum á íðefnum í landbúnaði er byggt á tiltölulega litlum mun (þ.e. meðalgildi ±25%) á milli nítratstyrkleika í samanburðarsýnum og meðhöndluðum jarðvegssýnum þannig að mikil frávik í samanburðinum geta leitt til rangra niðurstaðna. Munur milli samhliða samanburðarsýna skal því vera minni en ±15%.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Notuð eru prófunarílát úr efnafræðilega óvirku efni. Þau skulu vera af hæfilegri stærð miðað við aðferðina sem er notuð við ræktun jarðvegsins, þ.e. ræktun í lausu eða sem röð stakra jarðvegssýna (sjá lið 1.7.1.2). Þess skal gætt að halda vatnstapi í lágmarki og að loftskipti geti átt sér stað meðan prófunin stendur yfir (t.d. má leggja gataða pólýetýlenfilmu yfir prófunarílátin). Ef rokgjörn efni eru prófuð skal nota lokanleg og loftþétt ílát. Þau skulu vera af þeirri stærð að jarðvegssýnið fylli upp í u.þ.b. fjórðung af rúmmáli þeirra.

Notaður er staðlaður rannsóknarstofubúnaður, þ.m.t. eftirfarandi:

— hristari: vélhristari eða sambærilegur búnaður,

— skilvinda (3000 g) eða síunarbúnaður (með nítratfríum síupappír),

— tæki með nægilegan næmleika og samanburðarnákvæmni til greiningar á nítrati.

1.6.2. **Val á jarðvegsgerðum og fjöldi þeirra**

Aðeins er notuð ein gerð jarðvegs. Mælt er með jarðvegi með eftirfarandi eiginleikum:

— sandinnihald: ekki undir 50% og ekki yfir 75%,

— pH-gildi: 5,5–7,5,

— innihald lífræns kolefnis, 0,5–1,5%,

— mæla skal lífmassa örvera (8. og 9. heimild) og kolefnisinnihald hans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu, lífrænu kolefni jarðvegsins.

Í flestum tilvikum er jarðvegur með þessa eiginleika dæmi um verstu, hugsanlegu aðstæður þar eð ásog prófunaríðefnisins er í lágmarki en aðgengi að því fyrir örflóruna er í hámarki. Þar af leiðandi er prófun með öðrum gerðum jarðvegs alla jafna ónauðsynleg. Í sumum tilvikum, t.d. þegar gert er ráð fyrir því að nota prófunarefnið aðallega í sérstökum jarðvegi, s.s. súrum skógarjarðvegi, eða þegar um er að ræða íðefni með rafstöðuhleðslu, getur þó verið nauðsynlegt að nota aðra jarðvegsgerð.

1.6.3. **Taka og geymsla jarðvegssýna**

1.6.3.1. *Söfnun*

Nákvæmar upplýsingar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn skulu vera tiltækar. Upplýsingar eru m.a. nákvæm staðsetning, gróðurþekja, dagsetningar meðhöndlunar með plöntuverndarvörum, meðhöndlun með lífrænum eða ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun fyrir slysni. Velja skal stað fyrir jarðvegstöku sem unnt er að nota lengi. Fastabithagar, akrar með einærum korntegundum (nema maís) eða þétt sáðum grænáburði eru hentugir. Valinn sýnatökustaður skal ekki hafa fengið meðhöndlun með plöntuverndarvörum í a.m.k. eitt ár fyrir sýnatöku. Lífrænn áburður skal ekki heldur hafa verið borinn á í a.m.k. sex mánuði. Jarðefnaáburð má einungis nota þegar plönturnar hafa þörf fyrir hann og ekki skal taka jarðvegssýni fyrr en a.m.k. þrír mánuðir eru liðnir frá því að áburðurinn var borinn á. Forðast skal að nota jarðveg hafi verið borinn á hann áburður sem vitað er að hefur sæfandi áhrif (t.d. kalsíumsýanamíð).

Forðast skal að taka sýni á langvarandi tímabili (30 daga eða lengur) eða strax í kjölfar þess að ríkt hafa þurrkar eða þegar jarðvegurinn er vatnsósa. Af plægðum jarðvegi skal taka sýni á dýpinu 0 niður í 20 cm. Á graslendi (beitilandi) eða öðru landi, sem er ekki plægt yfir lengri tímabil (a.m.k. eitt vaxtarskeið), má hámarksdýpt sýnatöku vera lítið eitt meiri en 20 cm (t.d. að 25 cm).

Jarðvegssýni skulu flutt í þannig ílátum og við þannig hitaskilyrði að tryggt sé að upphaflegir eiginleikar jarðvegsins breytist ekki umtalsvert.

1.6.3.2. *Geymsla*

Æskilegast er að nota nýtekin jarðvegssýni af staðnum. Ef ekki er hægt að komast hjá því að geyma sýnin á rannsóknarstofunni má geyma þau í myrkri við 4 ±2 °C í þrjá mánuði hið mesta. Tryggja verður loftháðar aðstæður þar sem jarðvegurinn er í geymslu. Ef jarðvegur er tekinn af svæðum þar sem hann er frosinn í a.m.k. þrjá mánuði á ári kemur til greina að geyma hann í sex mánuði við –18 til –22 °C. Mæla skal lífmassa örvera í jarðvegi í geymslu fyrir hverja tilraun og kolefnið í lífmassanum skal vera a.m.k. 1% af heildarmagni lífræns kolefnis í jarðveginum (sjá lið 1.6.2).

1.6.4. **Meðhöndlun og tilreiðsla jarðvegs fyrir prófun**

1.6.4.1. *Forræktun*

Ef jarðvegurinn hefur verið í geymslu (sjá lið 1.6.3.2) er mælt með forræktun í 2 til 28 daga. Í forræktuninni skal hitastig og rakainnihald jarðvegsins vera svipað því sem notað er í prófuninni (sjá liði 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Eðlisefnafræðilegir eiginleikar*

Stærri stykki eru tínd úr jarðveginum (t.d. steinar, plöntuhlutar, o.s.frv.) og hann síðan sigtaður rakur án þess að hann þorni of mikið þar til kornastærð er minni en eða jöfn 2 mm. Rakainnihald jarðvegssýnisins skal stilla með eimuðu eða afjónuðu vatni að gildi á bilinu 40–60% af hámarks vatnsheldni.

1.6.4.3. *Auðgun með lífrænu æti*

Auðga skal jarðveginn með hentugu lífrænu æti, t.d. grænu refasmáramjöli (aðal efnisþáttur: Medicago sativa) með hlutfalli kolefnis/köfnunarefnis (C/N) á bilinu 12/1 og 16/1. Ráðlagt hlutfall refasmára og jarðvegs er 5 g af refasmára á hvert kíló jarðvegs (þurrvigt).

1.6.5. **Tilreiðsla prófunarefnis sem á að setja í jarðveg**

Prófunarefnið er alla jafna notað með burðarefni. Burðarefnið getur verið vatn (fyrir vatnsleysanleg efni) eða hvarftregt, fast efni, s.s. fínn kvarssandur (kornastærð: 0,1–0,5 mm). Forðast skal fljótandi burðarefni, önnur en vatn, (t.d. lífræna leysa s.s. aseton eða klóróform) þar eð þau geta skaðað örflóruna. Ef sandur er notaður sem burðarefni má húða hann með prófunarefninu, uppleystu eða í sviflausn í viðeigandi leysi. Í slíkum tilvikum skal fjarlægja leysinn með uppgufun fyrir íblöndun í jarðveginn. Til að prófunarefnið dreifist sem best í jarðveginum er mælt með 10 g af sandi á hvert kíló af jarðvegi (þurrvigt). Samanburðarsýni eru einungis meðhöndluð með sama magni af vatni og/eða kvarssandi.

Þegar rokgjörn íðefni eru prófuð skal forðast eins og framast er kostur að þau tapist í meðhöndluninni og reyna að tryggja einsleita dreifingu í jarðveginum (t.d. skal sprauta prófunarefninu í jarðveginn á mörgum stöðum).

1.6.6. **Prófunarstyrkleikar**

Við prófun á íðefnum í landbúnaði skal nota a.m.k. tvenns konar styrkleika. Minni styrkleikinn skal a.m.k. endurspegla mesta magn sem búist er við að berist í jarðveginn við raunhæfar aðstæður en meiri styrkleikinn skal vera margfeldi af minni styrkleikanum. Við útreikning á styrkleika prófunarefnis sem er sett í jarðveg er gengið út frá jafnri upptöku að 5 cm dýpi og að þéttleiki jarðvegs í lausu sé 1,5. Sé um að ræða íðefni í landbúnaði, sem eru sett beint í jarðveg, eða íðefni þar sem hægt er að spá fyrir um það magn sem berst í jarðveginn er mælt með því að prófunarstyrkleikar séu mesti, áætlaði styrkur í umhverfinu (PEC) og fimmfaldur sá styrkur. Efni, sem fyrirhugað er að setja í jarðveg nokkrum sinnum á einni árstíð, skulu prófuð í styrk sem er fenginn með því að margfalda áætlaðan styrk í umhverfinu með hámarksfjölda ísetninga sem gert er ráð fyrir. Efri styrkmörk, sem eru prófuð, skulu þó ekki fara yfir tífaldan hámarksstyrk við eina ísetningu. Ef önnur íðefni en íðefni í landbúnaði eru prófuð er notuð jafnhlutfallaröð a.m.k. fimm styrkleika. Styrkleikarnir, sem eru prófaðir, skulu spanna það svið sem þarf til að ákvarða EC_x-gildin.

1.7. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.7.1. **Váhrifaskilyrði**

1.7.1.1. *Meðhöndlun og samanburður*

Við prófun á íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í þrjá jafnþunga hluta. Burðarefni sem inniheldur efnið er blandað í tvo hluta en í þriðja hlutann er blandað burðarefni án efnis (samanburður). Mælt er með a.m.k. þremur samhliða prófunum fyrir bæði meðhöndlaðan og ómeðhöndlaðan jarðveg. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í sex jafnþunga hluta. Burðarefni sem inniheldur prófunarefnið er blandað í fimm hluta en í sjötta hlutann er blandað burðarefni án íðefnis. Mælt er með þremur samhliða prófunum fyrir bæði meðhöndlun og samanburð. Þess skal gætt að tryggja einsleita dreifingu prófunarefnisins í meðhöndluðum jarðvegssýnum. Forðast skal að jarðvegurinn þjappist við blöndun eða að kekkir myndist.

1.7.1.2. *Ræktun jarðvegssýna*

Ræktun jarðvegssýna getur farið fram á tvo vegu: sem safnsýni af hverjum meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi eða sem röð stakra og jafnstórra undirsýna af hverjum meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal þó aðeins framkvæma prófunina með röð stakra undirsýna. Þegar jarðvegur er ræktaður í lausu er mikið magn hverrar meðhöndlaðrar og ómeðhöndlaðrar gerðar af jarðvegi undirbúið og undirsýni tekin til greiningar eftir þörfum meðan á prófun stendur. Það magn sem er upphaflega undirbúið fyrir hverja meðhöndlun og samanburð fer eftir stærð undirsýnanna, fjölda samhliða sýna, sem eru notuð til greiningar og hámarksfjölda skipta þar sem búist er við að sýni verði tekin. Þegar jarðvegssýni eru ræktuð í lausu skulu þau blönduð vandlega áður en undirsýni eru tekin. Þegar jarðvegurinn er ræktaður sem röð stakra jarðvegssýna er hverju meðhöndluðu og ómeðhöndluðu jarðvegssýni í lausu skipt niður í þann fjölda undirsýna sem nauðsynlegur er og þau notuð eftir þörfum. Í tilraunum þar sem gera má ráð fyrir því að sýni verði tekin oftar en tvisvar skal undirbúa svo mörg undirsýni að nægi fyrir öll samhliða sýni og öll sýnatökuskipti. Setja skal a.m.k. þrjú samhliða sýni úr prófunarjarðveginum í ræktun við loftháð skilyrði (sjá lið 1.7.1.1). Í öllum prófunum skal nota viðeigandi ílát með nægilegu kollrúmi til að komast hjá því að loftfirrð skilyrði skapist. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal aðeins framkvæma prófunina með röð stakra undirsýna.

1.7.1.3. *Prófunarskilyrði og tímalengd*

Prófunin er framkvæmd í myrkri við stofuhita, 20 ±2 °C. Meðan á prófun stendur skal rakainnihaldi jarðvegssýnanna haldið á bilinu 40–60% af hámarksvatnsheldni jarðvegsins (sjá lið 1.6.4.2) með fráviki sem nemur ±5%. Bæta má við eimuðu, afjónuðu vatni eftir þörfum.

Prófunin skal standa yfir í 28 daga að lágmarki. Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er borið saman hlutfall nítratmyndunar í meðhöndluðum sýnum og samanburðarsýnum. Ef munurinn er meiri en 25% á 28. degi er prófuninni haldið áfram þar til munurinn er orðinn 25% eða minni eða í 100 daga að hámarki, eftir því hvort næst fyrr. Þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði er prófun hætt eftir 28 daga. Á 28. degi er nítratmagn í meðhöndluðum jarðvegssýnum og samanburðarsýnum ákvarðað og EC_x-gildin reiknuð.

1.7.2. **Sýnataka og greining jarðvegs**

1.7.2.1. *Áætlun fyrir töku jarðvegssýna*

Við prófun íðefna í landbúnaði eru jarðvegssýni greind m.t.t. nítrats á degi 0, 7, 14 og 28. Ef framlengja þarf prófunina skulu frekari mælingar gerðar með 14 daga millibili eftir 28. daginn.

Við prófun annarra íðefna en íðefna í landbúnaði eru notaðir a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar og jarðvegssýnin greind m.t.t. nítrats í upphafi (dagur 0) og við lok váhrifatímabils (dagur 28). Bæta má við millimælingu, t.d. á 7. degi, ef það er talið nauðsynlegt. Gögnin, sem fást á 28. degi, eru notuð til að ákvarða EC_x-gildi íðefnisins. Ef þess er óskað má nota gögn úr samanburðarsýnum frá degi 0 til að greina frá upphaflegu magni nítrats í jarðveginum.

1.7.2.2. *Greining jarðvegssýna*

Það magn nítrats, sem hefur myndast í hverju meðhöndluðu sýni og samhliða samanburðarsýni, er ákvarðað í hvert skipti sem sýni eru tekin. Nítrat er dregið úr jarðveginum með því að hrista sýnin með heppilegum útdráttarleysi, t.d. 0,1 M kalíumklóríðlausn. Mælt er með hlutfallinu 5 ml af kalíumklóríðlausn á hvert gramm jarðvegs (þurrvigt). Til að hámarka útdrátt skulu ílát sem innihalda jarðveg og útdráttarlausn ekki vera meira en hálffull. Blöndurnar eru hristar í 60 mínútur við 150 snúninga á mínútu. Blöndurnar eru skildar í skilvindu eða síaðar og vökvafasarnir greindir m.t.t. nítrats. Agnafrían vökvaútdrátt má geyma við –20 ±5 °C í allt að sex mánuði fyrir greiningu.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Ef prófanir eru gerðar með íðefnum í landbúnaði skal nítratmagnið, sem hefur myndast í hverju samhliða jarðvegssýni, skráð og meðalgildi fyrir öll samhliða sýni sett fram í töfluformi. Meta skal ummyndunarhraða köfnunarefnis með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum (t.d. F-prófun, 5% marktækni). Nítratmagnið sem myndast er gefið upp sem mg nítrats á kg af þurrum jarðvegi á dag. Hlutfall nítrats, sem myndast í hverju meðhöndluðu sýni, er borið saman við hlutfallið í samanburðarsýnunum og frávik frá samanburðarsýnum reiknað í hundraðshlutum.

Ef prófanir eru gerðar með öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði skal nítratmagnið, sem hefur myndast í hverju samhliða sýni, ákvarðað og skammtasvörunarferill dreginn upp til að ákvarða EC_x-gildin. Nítratmagnið í meðhöndluðum sýnum (þ.e. mg nítrats á kg af þurrum jarðvegi) eftir 28 daga er borið saman við magnið í samanburðarsýnunum. Þessi gögn eru notuð til að reikna út hömlunargildin í hundraðshlutum fyrir hvern prófunarstyrk. Þessir hundraðshlutar eru settir fram á línuriti á móti styrk og síðan eru notaðar tölfræðiaðferðir til að reikna út EC_x-gildin Öryggismörk ($p = 0,95$) fyrir reiknuðu EC_x-gildin eru einnig ákvörðuð með stöðluðum aðferðum (10.–12. heimild).

Prófunarefni, sem innihalda mikið magn köfnunarefnis, geta haft áhrif á magn nítrats sem myndast meðan prófunin stendur. Ef þessi efni eru prófuð við mikinn styrk (t.d. með íðefnum sem fyrirhugað er að nota endurtekið) verður að setja upp viðeigandi samanburð í prófuninni (t.d. jarðveg með prófunarefni en án plöntumjöls). Taka verður tillit til gagna úr þessum samanburðarsýnum við útreikning á EC_x-gildum.

2.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Þegar niðurstöður úr prófunum á íðefnum í landbúnaði eru metnar og munurinn á hlutfalli nítrats, sem myndast við lægri styrkleika (þ.e. áætlaðan hámarksstyrk) og í samanburðinum, er jafn eða minni en 25% við hverja sýnatöku eftir 28. dag má líta svo á að efnið hafi engin langtímaáhrif á köfnunarefnisummyndun í jarðvegi. Við mat á niðurstöðum úr prófunum með íðefnum, öðrum en íðefnum í landbúnaði, eru gildin fyrir EC_{50}, EC_{25} og/eða EC_{10} notuð.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Heildarupplýsingar um jarðveginn sem er notaður, þ.m.t.:

— landfræðileg viðmiðun fyrir staðinn (breiddar- og lengdargráða),

— upplýsingar um sögu staðarins (þ.e. gróðurþekja, meðhöndlun með plöntuverndarvörum, meðhöndlun með áburði, mengun fyrir slysni o.s.frv.),

— notkunarmynstur (t.d. nytjajarðvegur, skógur o.s.frv.),

— dýpt sýnatöku (cm),

— sand-/silt-/leirinnihald (% þurrvigt),

— sýrustig (í vatni),

— innihald lífræns kolefnis (% þurrvigt),

— innihald köfnunarefnis (% þurrvigt),

— upphaflegur styrkur nítrats (mg nítrat/kg þurrvigt),

— plúsjónaskiptageta (mmól/kg),

— lífmassi örvera, gefinn upp sem hundraðshluti af heildarmagni lífræns kolefnis,

— tilvísun til aðferða sem eru notaðar við ákvörðun hvers mæliþáttar,

— allar upplýsingar um töku og geymslu jarðvegssýna,

— nákvæmar upplýsingar um forræktun jarðvegs, ef um hana er að ræða.

Prófunarefni:

— eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, ef við á, þ.m.t. byggingarformúla, hreinleiki (þ.e. hundraðshluti virks efnis ef um plöntuverndarvörur er að ræða) og köfnunarefnisinnihald.

Æti:

— uppruni ætis,

— samsetning (þ.e. refasmáramjöl, grænt refasmáramjöl),

— innihald kolefnis og köfnunarefnis (% þurrvigt),

— möskvastærð sigtis (mm).

Prófunarskilyrði:

— nákvæmar upplýsingar um auðgun jarðvegs með lífrænu æti,

— fjöldi styrkleika prófunaríðefnis sem er notað og, ef við á, rökstuðningur fyrir því hvaða styrkleikar eru valdir,

— nákvæmar upplýsingar um ísetningu prófunarefnis í jarðveginn,

— ræktunarhiti,

— rakainnihald jarðvegsins við upphaf prófunar og meðan á henni stendur,

— aðferð sem er notuð við ræktun jarðvegsins (þ.e. í lausu eða sem röð stakra undirsýna),

— fjöldi samhliða sýna,

— sýnatökutímar,

— aðferð sem er notuð til að draga nítrat úr jarðvegi,

Niðurstöður:

— greiningaraðferð og búnaður sem er notaður til að greina nítrat,

— gögn í töflum, þ.m.t. stök gildi og meðalgildi fyrir nítratmælingar,

— mismunur á samhliða sýnum meðhöndlaðra sýna og samanburðarsýna,

— útskýringar á leiðréttingum sem gerðar eru á útreikningum, ef við á,

— mismunur á hlutfalli nítratmyndunar í hundraðshlutum á hverjum sýnatökutíma eða, ef við á, gildið fyrir EC_{50} með 95% öryggismörkum, önnur EC_x-gildi (t.d. EC_{25} eða EC_{10}) með öryggisbilum svo og línurit sem sýnir skammtasvörunarferil,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna,

— allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

1) EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2) BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3) EPA (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) ISO/DIS 14238 (1995) Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality — Biological Methods.

6) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18- 20 January 1995.

7) ISO 10381-6 (1993) Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

8) ISO 14240-1, (1997) Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

9) ISO 14240-2, (1997) Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, bls. 99-113.

11) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

12) Finney, D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.22. ÖRVERUR Í JARÐVEGI: PRÓFUN Á KOLEFNISUMMYNDUN

1. AÐFERÐ

Þessi aðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 217 um prófanir (2000).

1.1. INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til rannsóknar á því hvaða langtímaáhrif það getur haft á kolefnisummyndun örvera í jarðvegi ef þær verða fyrir váhrifum af plöntuverndarvörum og hugsanlega öðrum íðefnum einu sinni. Prófunin byggist mestmegnis á leiðbeiningum Samtaka um plöntuvernd í Evrópu og á Miðjarðarhafssvæðinu (1. heimild). Þó var einnig tekið tillit til annarra leiðbeininga, þ.m.t. frá Biologische Bundesanstalt í Þýskalandi (2. heimild), Umhverfisverndarstofnun Bandaríkjanna (3. heimild) og SETAC (4. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgirate á Ítalíu árið 1995 (5. heimild), var gerð samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hve margar skyldi nota í þessari prófun. Ráðleggingar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna eru byggðar á leiðbeiningaskjali ISO (6. heimild) og ráðleggingum frá vinnufundinum í Belgirate.

Við mat og úttekt á eitureigineikum prófunarefna getur reynst nauðsynlegt að ákvarða áhrif á virkni örvera í jarðvegi, t.d þegar þörf er á gögnum um hugsanlegar aukaverkanir plöntuverndarvara á örflóru í jarðvegi eða þegar þess er vænst að örverur í jarðvegi verði fyrir váhrifum af öðrum íðefnum en plöntuverndarvörum. Prófun á kolefnisummyndun er gerð til að ákvarða áhrif slíkra íðefna á örflóru í jarðvegi. Ef gerð er prófun á íðefnum í landbúnaði (t.d. plöntuverndarvörum, áburði, íðefnum í skógrækt) eru gerðar prófanir á bæði kolefnis- og köfnunarefnisummyndun Ef um er að ræða prófanir á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði nægir prófun á köfnunarefnisummyndun. Ef slík íðefni eru prófuð m.t.t. köfnunarefnisummyndunar, og EC_{50}-gildi eru á því bili sem þekkist fyrir nítrunarlata, sem fást á almennum markaði (t.d. nítrapýrín), má þó afla frekari upplýsinga með því að gera prófun á kolefnisummyndun.

Jarðvegur er gerður úr lífrænum og ólífrænum þáttum sem koma fyrir í flóknum og sundurleitum samsetningum. Örverur gegna mikilvægu hlutverki í niðurbroti og ummyndun lífræns efnis í frjósömum jarðvegi og margar tegundir hafa áhrif á ólíka þætti í frjósemi jarðvegsins. Langvarandi röskun á þessum lífefnafræðilegu ferlum gæti hugsanlega raskað hringrás næringarefna sem getur breytt frjósemi jarðvegsins. Ummyndun á kolefni og köfnunarefni á sér stað í öllum frjósömum jarðvegi. Þótt örverusamfélögin, sem valda þessum ferlum, séu breytileg eftir jarðvegsgerðum eru ummyndunarferlin í meginatriðum þau sömu.

Prófunaraðferðinni er ætlað að greina skaðleg langtímaáhrif efnis á ferli kolefnisummyndunar í yfirborðsjarðvegi við lofthöðar aðstæður. Prófunin er næm fyrir breytingum á stærð og starfsemi örverusamfélaganna sem valda kolefnisummyndun sökum þess að hún veldur þessum samfélögum bæði efnafræðilegu álagi og kolefnissvelti. Notaður er sendinn jarðvegur sem inniheldur lítið af lífrænu efni. Jarðvegurinn er meðhöndlaður með prófunarefninu og ræktaður við skilyrði sem gera hröð efnaskipti örveranna möguleg. Við þessi skilyrði gengur það kolefnisinnihald jarðvegsins, sem er auðveldlega aðgengilegt, fljótt til þurrðar. Þetta veldur kolefnissvelti sem bæði drepur frumur örvera og framkallar dvala og/eða grómyndun. Ef prófunin stendur yfir lengur en í 28 daga er hægt að fylgjast með þessum efnahvörfum í samanburðarsýnunum (ómeðhöndlaður jarðvegur) sem koma fram sem stigvaxandi tap örverulífmassa með virkum efnaskiptum (7. heimild). Ef lífmassi jarðvegs, þar sem kolefnissvelti ríkir, verður fyrir áhrifum frá íðefnum við prófunarskilyrði er ekki víst að hann nái aftur því ástandi sem er í samanburðarsýninu. Röskun, sem prófunarefnið veldur einhvern tíma í prófuninni, helst því oft fram til loka prófunarinnar.

Prófanirnar, sem þessi prófunaraðferð byggist á, voru upphaflega hannaðar fyrir efni þar sem hægt er að gera ráð fyrir magninu sem berst í jarðveginn Þetta á t.d. við um plöntuverndarvörur þar sem vitað er hversu miklu hefur verið dreift á viðkomandi land. Þegar um er að ræða íðefni í landbúnaði nægir að prófa tvo skammta sem eru hæfilegir með tilliti til þess magns sem ráðgert er eða áætlað að nota. Prófa má íðefni í landbúnaði sem virk innihaldsefni eða sem samsettar vörur. Prófunin er þó ekki bundin við íðefni með fyrirsjáanlegan styrk í umhverfinu. Með því að breyta bæði magni prófunarefnisins, sem er sett í jarðveginn, og því hvernig gögnin eru metin má einnig nota prófunina fyrir íðefni þar sem ekki er vitað hversu mikið magn má búast við að berist í jarðveginn. Á þann hátt eru áhrifin af röð styrkleika á kolefnisummyndun ákvörðuð þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði. Gögnin úr þessum prófunum eru notuð til að draga upp skammtasvörunarferil og reikna út EC_x-gildi þar sem x er skilgreindur hundraðshluti áhrifa

1.2. SKILGREININGAR

Kolefnisummyndun: niðurbrot lífræns efnis af völdum örvera þar sem ólífræn lokaafurð, koltvísýringur, myndast.

EC_x (hrifstyrkur): styrkur prófunarefnisins í jarðvegi sem leiðir til hömlunar á ummyndun kolefnis yfir í koltvísýring sem nemur x hundraðshlutum.

EC_{50} (miðgildi hrifstyrks): styrkur prófunarefnis í jarðvegi sem leiðir til 50% hömlunar á ummyndun kolefnis í koltvísýring.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Engin.

1.4. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Sigtaður jarðvegur er annaðhvort meðhöndlaður með prófunarefninu eða látinn óhreyfður (samanburður). Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er mælt með a.m.k. tvenns konar prófunarstyrkleika sem velja skal með hliðsjón af mesta styrk sem gert er ráð fyrir á staðnum. Eftir 0, 7, 14 og 28 daga ræktun er glúkósa blandað saman við meðhöndluð sýni úr jarðvegi og samanburðarsýni og glúkósaörvuð öndun er mæld í 12 klst. samfleytt. Öndunin er gefin upp sem koltvísýringur sem losnar (mg koltvísýringur/kg af þurrum jarðvegi/klst.) eða sem súrefni sem er tekið upp (mg súrefnis/kg af jarðvegi/klst.). Meðalöndunin í meðhöndluðu jarðvegssýnunum er borin saman við meðalöndun í samanburðarsýnunum og hlutfallslegt frávik meðhöndlaðra sýna miðað við samanburð reiknað út. Allar prófanir standa yfir í a.m.k. 28 daga. Ef munurinn milli meðhöndlaðs jarðvegs og samanburðarjarðvegs er 25% eða meiri á 28. degi er mælingum haldið áfram með 14 daga millibili í að hámarki 100 daga. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er röð styrkleika af prófunarefni bætt í jarðvegssýnin og öndunin örvuð með glúkósa (þ.e. meðaltal koltvísýringsmagns sem myndast eða súrefnis sem er tekið upp) er mæld eftir 28 daga. Niðurstöður úr prófunum með röð mismunandi styrkleika eru greindar og notað aðhvarfslíkan og EC_x-gildin reiknuð út (þ.e. EC_{50}, EC_{25} og/eða EC_{10}). Sjá skilgreiningar.

1.5. GILDI PRÓFUNARINNAR

Mat á niðurstöðum úr prófunum á íðefnum í landbúnaði er byggt á tiltölulega litlum mun (t.d. meðalgildi ±25%) á milli koltvísýrings sem losnar eða súrefnis sem er tekið upp í (eða úr) samanburðarsýnum og meðhöndluðum sýnum jarðvegs þannig að mikil frávik í samanburðinum geta leitt til rangrar niðurstöðu. Munur milli samhliða samanburðarsýna skal því vera minni en ±15%.

1.6. LÝSING Á PRÓFUNARAÐFERÐINNI

1.6.1. **Búnaður**

Notuð eru prófunarílát úr efnafræðilega óvirku efni Þau skulu vera af hæfilegri stærð miðað við aðferðina sem er notuð við ræktun jarðvegsins, þ.e. ræktun í lausu eða sem röð stakra jarðvegssýna (sjá lið 1.7.1.2). Þess skal gætt að halda vatnstapi í lágmarki og að loftskipti geti átt sér stað meðan prófunin stendur yfir (t.d. má leggja gataða pólýetýlenfilmu yfir prófunarílátin). Ef rokgjörn efni eru prófuð skal nota lokanleg og loftþétt ílát. Þau skulu vera af þeirri stærð að jarðvegssýnið fylli upp í u.þ.b. fjórðung af rúmmáli þeirra.

Til að ákvarða glúkósaörvaða öndun er nauðsynlegt að hafa ræktunarkerfi og tæki til að mæla koltvísýringsframleiðslu eða súrefnisupptöku. Dæmi um slík kerfi og tæki má finna í 8.–11. heimild.

1.6.2. **Val á jarðvegsgerðum og fjöldi þeirra**

Aðeins er notuð ein gerð jarðvegs. Mælt er með jarðvegi með eftirfarandi eiginleikum:

— sandinnihald: ekki undir 50% og ekki yfir 75%,

— pH-gildi: 5,5–7,5,

— innihald lífræns kolefnis: 0,5–1,5%

— mæla skal lífmassa örvera (12. og 13. heimild) og kolefnisinnihald hans skal vera a.m.k. 1% af samanlögðu, lífrænu kolefni jarðvegsins.

Í flestum tilvikum er jarðvegur með þessa eiginleika dæmi um verstu, hugsanlegu aðstæður þar eð ásog prófunaríðefnisins er í lágmarki en aðgengi að því fyrir örflóruna er í hámarki. Þar af leiðandi er prófun með öðrum gerðum jarðvegs alla jafna ónauðsynleg. Í sumum tilvikum, t.d. þegar gert er ráð fyrir því að nota prófunaríðefnið aðallega í sérstökum jarðvegi, s.s. súrum skógarjarðvegi, eða þegar um er að ræða íðefni með rafstöðuhleðslu, getur þó verið nauðsynlegt að nota aðra jarðvegsgerð.

1.6.3. **Taka og geymsla jarðvegssýna**

1.6.3.1. *Söfnun*

Nákvæmar upplýsingar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn skulu vera tiltækar. Upplýsingar eru m.a. nákvæm staðsetning, gróðurþekja, dagsetningar meðhöndlunar með plöntuverndarvörum, meðhöndlun með lífrænum eða ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun fyrir slysni. Velja skal stað fyrir jarðvegstöku sem unnt er að nota lengi. Fastabithagar, akrar með einærum korntegundum (nema maís) eða þétt sáðum grænáburði eru hentugir. Valinn sýnatökustaður skal ekki hafa fengið meðhöndlun með plöntuverndarvörum í a.m.k. eitt ár fyrir sýnatöku. Lífrænn áburður skal ekki heldur hafa verið borinn á í a.m.k. sex mánuði. Jarðefnaáburð má einungis nota þegar plönturnar hafa þörf fyrir hann og ekki skal taka jarðvegssýni fyrr en a.m.k. þrír mánuðir eru liðnir frá því að áburðurinn var borinn á. Forðast skal að nota jarðveg hafi verið borinn á hann áburður sem vitað er að hefur sæfandi áhrif (t.d. kalsíumsýanamíð).

Forðast skal að taka sýni á langvarandi tímabili (30 daga eða lengur) eða strax í kjölfar þess að ríkt hafa þurrkar eða þegar jarðvegurinn er vatnsósa. Af plægðum jarðvegi skal taka sýni á dýpinu 0 niður í 20 cm. Á graslendi (beitilandi) eða öðru landi, sem er ekki plægt yfir lengri tímabil (a.m.k. eitt vaxtarskeið), má hámarksdýpt sýnatöku vera lítið eitt meiri en 20 cm (t.d. að 25 cm). Jarðvegssýni skulu flutt í þannig ílátum og við þannig hitaskilyrði að tryggt sé að upphaflegir eiginleikar jarðvegsins breytist ekki umtalsvert.

1.6.3.2. *Geymsla*

Æskilegast er að nota nýtekin jarðvegssýni af staðnum. Ef ekki er hægt að komast hjá því að geyma sýnin á rannsóknarstofunni má geyma þau í myrkri við 4 ±2 °C í þrjá mánuði hið mesta. Tryggja verður loftháðar aðstæður þar sem jarðvegurinn er í geymslu. Ef jarðvegur er tekinn af svæðum þar sem hann er frosinn í a.m.k. þrjá mánuði á ári kemur til greina að geyma hann í sex mánuði við –18 °C. Mæla skal lífmassa örvera í jarðvegi í geymslu fyrir hverja tilraun og kolefnið í lífmassanum skal vera a.m.k. 1% af heildarmagni lífræns kolefnis í jarðveginum (sjá lið 1.6.2).

1.6.4. **Meðhöndlun og tilreiðsla jarðvegs fyrir prófun**

1.6.4.1. *Forræktun*

Ef jarðvegurinn hefur verið í geymslu (sjá lið 1.6.4.2 og 1.7.1.3) er mælt með forræktun í 2 til 28 daga. Í forræktuninni skal hitastig og rakainnihald jarðvegsins vera svipað því sem notað er í prófuninni (sjá liði 1.6.4.2 og 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Eðlisefnafræðilegir eiginleikar*

Stærri stykki eru tínd úr jarðveginum (t.d. steinar, plöntuhlutar, o.s.frv.) og hann síðan sigtaður rakur án þess að hann þorni of mikið þar til kornastærð er minni en eða jöfn 2 mm. Rakainnihald jarðvegssýnisins skal stilla með eimuðu eða afjónuðu vatni að gildi á bilinu 40–60% af hámarks vatnsheldni.

1.6.5. **Tilreiðsla prófunarefnis sem á að setja í jarðveg**

Prófunarefnið er alla jafna notað með burðarefni. Burðarefnið getur verið vatn (fyrir vatnsleysanleg efni) eða hvarftregt, fast efni, s.s. fínn kvarssandur (kornastærð: 0,1–0,5 mm. Forðast skal fljótandi burðarefni, önnur en vatn (t.d. lífræna leysa s.s. aseton eða klóróform) þar eð þau geta skaðað örflóruna. Ef sandur er notaður sem burðarefni má húða hann með prófunarefninu, uppleystu eða í sviflausn í viðeigandi leysi. Í slíkum tilvikum skal fjarlægja leysinn með uppgufun fyrir íblöndun í jarðveginn Til að prófunarefnið dreifist sem best í jarðveginum er mælt með 10 g af sandi á hvert kíló af jarðvegi (þurrvigt). Samanburðarsýni eru einungis meðhöndluð með sama magni af vatni og/eða kvarssandi.

Þegar rokgjörn íðefni eru prófuð skal forðast eins og framast er kostur að þau tapist í meðhöndluninni og reyna að tryggja einsleita dreifingu í jarðveginum (t.d. skal sprauta prófunarefninu í jarðveginn á mörgum stöðum).

1.6.6. **Prófunarstyrkleikar**

Við prófun á plöntuverndarvörum eða öðrum íðefnum með áætluðum styrk í umhverfinu skal nota a.m.k. tvenns konar styrkleika. Minni styrkleikinn skal a.m.k. endurspegla mesta magn sem búist er við að berist í jarðveginn við raunhæfar aðstæður en meiri styrkleikinn skal vera margfeldi af minni styrkleikanum. Við útreikning á styrkleika prófunarefnis sem er sett í jarðveg er gengið út frá jafnri upptöku að 5 cm dýpi og að þéttleiki jarðvegs í lausu sé 1,5. Sé um að ræða íðefni í landbúnaði, sem eru sett beint í jarðveg, eða íðefni þar sem hægt er að spá fyrir um það magn sem berst í jarðveginn er mælt með því að prófunarstyrkleikar séu mesti, áætlaði styrkur í umhverfinu (PEC) og fimmfaldur sá styrkur. Efni, sem fyrirhugað er að setja í jarðveg nokkrum sinnum á einni árstíð, skulu prófuð í styrk sem er fenginn með því að margfalda áætlaðan styrk í umhverfinu með hámarksfjölda ísetninga sem gert er ráð fyrir. Efri styrkmörk, sem eru prófuð, skulu þó ekki fara yfir tífaldan hámarksstyrk við eina ísetningu.

Ef önnur íðefni en íðefni í landbúnaði eru prófuð er notuð jafnhlutfallaröð a.m.k. fimm styrkleika. Styrkleikarnir, sem eru prófaðir, skulu spanna það svið sem þarf til að ákvarða EC_x-gildin.

1.7. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.7.1. **Váhrifaskilyrði**

1.7.1.1. *Meðhöndlun og samanburður*

Við prófun á íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í þrjá jafnþunga hluta. Burðarefni sem inniheldur efnið er blandað í tvo hluta en í þriðja hlutann er blandað burðarefni án efnis (samanburður). Mælt er með a.m.k. þremur samhliða prófunum fyrir bæði meðhöndlaðan og ómeðhöndlaðan jarðveg. Við prófun á öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði er jarðveginum skipt í sex jafnþunga hluta. Burðarefni sem inniheldur prófunarefnið er blandað í fimm hluta en í sjötta hlutann er blandað burðarefni án íðefnis. Mælt er með þremur samhliða prófunum fyrir bæði meðhöndlun og samanburð. Þess skal gætt að tryggja einsleita dreifingu prófunarefnisins í meðhöndluðum jarðvegssýnum. Forðast skal að jarðvegurinn þjappist við blöndun eða að kekkir myndist.

1.7.1.2. *Ræktun jarðvegssýna*

Ræktun jarðvegssýna getur farið fram á tvo vegu: sem safnsýni af hverjum meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi eða sem röð stakra og jafnstórra undirsýna af hverjum meðhöndluðum og ómeðhöndluðum jarðvegi. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal þó aðeins framkvæma prófunina með röð stakra undirsýna. Þegar jarðvegur er ræktaður í lausu er mikið magn hverrar meðhöndlaðrar og ómeðhöndlaðrar gerðar af jarðvegi undirbúið og undirsýni tekin til greiningar eftir þörfum meðan á prófun stendur. Það magn sem er upphaflega undirbúið fyrir hverja meðhöndlun og samanburð fer eftir stærð undirsýnanna, fjölda samhliða sýna, sem eru notuð til greiningar og hámarksfjölda skipta þar sem búist er við að sýni verði tekin. Þegar jarðvegssýni eru ræktuð í lausu skulu þau blönduð vandlega áður en undirsýni eru tekin. Þegar jarðvegurinn er ræktaður sem röð stakra jarðvegssýna er hverju meðhöndluðu og ómeðhöndluðu jarðvegssýni í lausu skipt niður í þann fjölda undirsýna sem nauðsynlegur er og þau notuð eftir þörfum. Í tilraunum þar sem gera má ráð fyrir því að sýni verði tekin oftar en tvisvar skal undirbúa svo mörg undirsýni að nægi fyrir öll samhliða sýni og öll sýnatökuskipti. Setja skal a.m.k. þrjú samhliða sýni úr prófunarjarðveginum í ræktun við lofthá skilyrði (sjá lið 1.7.1.1). Í öllum prófunum skal nota viðeigandi ílát með nægilegu kollrúmi til að komast hjá því að loftfirrð skilyrði skapist. Þegar rokgjörn efni eru prófuð skal aðeins framkvæma prófunina með röð stakra undirsýna.

1.7.1.3. *Prófunarskilyrði og tímalengd*

Prófunin er framkvæmd í myrkri við stofuhita, 20 ±2 °C. Meðan á prófun stendur skal rakainnihaldi jarðvegssýnanna haldið á bilinu 40–60% af hámarksvatnsheldni jarðvegsins (sjá lið 1.6.4.2) með fráviki sem nemur ±5%. Bæta má við eimuðu, afjónuðu vatni eftir þörfum.

Prófunin skal standa yfir í 28 daga að lágmarki. Ef íðefni í landbúnaði eru prófuð er borið saman magn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í meðhöndluðum sýnum og samanburðarsýnum. Ef munurinn er meiri en 25% á 28. degi er prófuninni haldið áfram þar til munurinn er orðinn 25% eða minni eða í 100 daga að hámarki, eftir því hvort næst fyrr. Þegar um er að ræða önnur íðefni en íðefni í landbúnaði er prófun hætt eftir 28 daga. Á 28. degi er magn losaðs koltvísýrings eða súrefnisupptöku í meðhöndluðum jarðvegssýnum og samanburðarsýnum ákvarðað og EC_x-gildi reiknuð.

1.7.2. **Sýnataka og greining jarðvegs**

1.7.2.1. *Áætlun fyrir töku jarðvegssýna*

Við prófun íðefna í landbúnaði eru jarðvegssýni greind m.t.t. glúkósaörvaðrar öndunar á degi 0, 7, 14 og 28. Ef framlengja þarf prófunina skulu frekari mælingar gerðar með 14 daga millibili eftir 28. daginn.

Við prófun annarra íðefna en íðefna í landbúnaði eru notaðir a.m.k. fimm prófunarstyrkleikar og jarðvegssýnin greind m.t.t. glúkósaörvaðrar öndunar í upphafi (dagur 0) og við lok váhrifatímabils (dagur 28). Bæta má við millimælingu, t.d. á 7. degi, ef það er talið nauðsynlegt. Gögnin, sem fást á 28. degi, eru notuð til að ákvarða EC_x-gildi íðefnisins. Ef þess er óskað má nota gögn úr samanburðarsýnum frá degi 0 til að áætla upphaflegt magn lífmassa jarðvegsörvera með virkum efnaskiptum (12. heimild).

1.7.2.2. *Mæling á glúkósaörvaðri öndun*

Glúkósaörvuð öndun er ákvörðuð í hverju samhliða sýni með meðhöndlun og til samanburðar í hvert skipti sem sýni eru tekin. Jarðvegssýnin eru blönduð með nægilegu magni af glúkósa til að kalla samstundis fram hámarkssvörun í öndun. Hægt er að ákvarða það magn glúkósa sem þarf til að kalla fram hámarkssvörun í öndun í tilteknum jarðvegi með forprófun þar sem notuð er röð styrkleika af glúkósa (14. heimild). Þegar um er að ræða sendinn jarðveg með 0,5–1,5% lífrænu kolefni nægir þó venjulega að nota 2000–4000 mg af glúkósa á hvert kg af þurrvigtuðum jarðvegi. Glúkósann má mala í duft með hreinum kvarssandi (10 g sandur/kg af þurrum jarðvegi) og blanda honum síðan jafnt við jarðveginn.

Jarðvegssýnin með glúkósanum eru ræktuð í hentugum búnaði til að mæla öndunina, annaðhvort stöðugt á klukkutíma fresti eða á tveggja tíma fresti (sjá lið 1.6.1) við 20 ±2 °C. Koltvísýringslosunin eða súrefnisupptakan er mæld í 12 klukkustundir samfleytt og mælingar skulu hefjast svo fljótt sem unnt er, þ.e. innan einnar eða tveggja klukkustunda eftir glúkósaíbætinguna. Heildarmagn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í 12 klukkustundir er mælt og meðalöndunin ákvörðuð.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Ef prófanir eru gerðar með íðefnum úr landbúnaði skal koltvísýringslosun eða súrefnisupptaka í hverju samhliða jarðvegssýni skráð og meðalgildi fyrir öll samhliða sýni sett fram í töfluformi. Meta skal niðurstöðurnar með viðeigandi og almennt viðurkenndum tölfræðilegum aðferðum (t.d. F-prófun, 5% marktækni). Glúkósaörvuð öndun er gefin upp í mg koltvísýrings/kg af þurrum jarðvegi/klst. eða mg súrefnis/kg af þurrum jarðvegi/klst. Meðalhlutfall koltvísýringsmyndunar eða meðalhlutfall súrefnisupptöku í hverri meðhöndlun er borin saman við hlutfallið í samanburðinum og frávik frá samanburðarsýnum reiknað í hundraðshlutum.

Ef prófanir eru gerðar með öðrum íðefnum en íðefnum í landbúnaði skal magn koltvísýringslosunar eða súrefnisupptöku í hverju samhliða sýni ákvarðað og skammtasvörunarferill dreginn upp til að ákvarða EC_x-gildin Glúkósaörvuð öndun (þ.e. mg koltvísýrings/kg af þurrum jarðvegi/klst. eða mg súrefnis/kg af þurrum jarðvegi/klst.), sem kemur í ljós í meðhöndluðu sýnunum eftir 28 daga, er borin saman við gildin fyrir samanburðarsýnin. Þessi gögn eru notuð til að reikna út hömlunargildin í hundraðshlutum fyrir hvern prófunarstyrk. Þessir hundraðshlutar eru settir fram á línuriti á móti styrk og síðan eru notaðar tölfræðiaðferðir til að reikna út EC_X-gildin Öryggismörk (p = 0,95) fyrir reiknuðu EC_x-gildin eru einnig ákvörðuð með stöðluðum aðferðum (15.–17. heimild).

2.2. TÚLKUN NIÐURSTAÐNA

Þegar niðurstöður úr prófunum á íðefnum í landbúnaði eru metnar og munurinn á önduninni við lægri styrkleika (þ.e. áætlaðan hámarksstyrk) og í samanburðinum er jafn eða minni en 25% við hverja sýnatöku eftir 28. dag má líta svo á að efnið hafi engin langtímaáhrif á kolefnisummyndun í jarðvegi. Við mat á niðurstöðum úr prófunum með íðefnum, öðrum en íðefnum í landbúnaði, eru gildin fyrir EC_{50}, EC_{25} og/eða EC_{10} notuð.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Heildarupplýsingar um jarðveginn sem er notaður, þ.m.t.:

— landfræðileg viðmiðun fyrir staðinn (breiddar- og lengdargráða),

— upplýsingar um sögu staðarins (þ.e. gróðurþekja, meðhöndlun með plöntuverndarvörum, meðhöndlun með áburði, mengun fyrir slysni o.s.frv.),

— notkunarmynstur (t.d. nytjajarðvegur, skógur o.s.frv.),

— dýpt sýnatöku (cm),

— sand-/silt-/leirinnihald (% þurrvigt),

— sýrustig (í vatni),

— innihald lífræns kolefnis (% þurrvigt),

— innihald köfnunarefnis (% þurrvigt),

— plúsjónaskiptageta (mmól/kg),

— upphaflegur lífmassi örvera, gefinn upp sem hundraðshluti af heildarmagni lífræns kolefnis,

— tilvísun til aðferða sem eru notaðar við ákvörðun hvers mæliþáttar,

— allar upplýsingar um töku og geymslu jarðvegssýna,

— nákvæmar upplýsingar um forræktun jarðvegs, ef um hana er að ræða.

Prófunarefni:

— eðlisástand og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,

— efnafræðileg sanngreiningargögn, ef við á, þ.m.t. byggingarformúla, hreinleiki (þ.e. hundraðshluti virks efnis ef um plöntuverndarvörur er að ræða) og köfnunarefnisinnihald.

Prófunarskilyrði:

— nákvæmar upplýsingar um auðgun jarðvegs með lífrænu æti,

— fjöldi styrkleika prófunaríðefnis sem er notað og, ef við á, rökstuðningur fyrir því hvaða styrkleikar eru valdir,

— nákvæmar upplýsingar um ísetningu prófunarefnis í jarðveginn,

— ræktunarhiti,

— rakainnihald jarðvegsins við upphaf prófunar og meðan á henni stendur,

— aðferð sem er notuð við ræktun jarðvegsins (þ.e. í lausu eða sem röð stakra undirsýna),

— fjöldi samhliða sýna,

— sýnatökutímar.

Niðurstöður:

— aðferð og búnaður sem er notaður við mælingu á öndun,

— gögn í töflum, þ.m.t. stök gildi og meðalgildi fyrir magn koltvísýrings eða súrefnis,

— mismunur á samhliða sýnum meðhöndlaðra sýna og samanburðarsýna,

— útskýringar á leiðréttingum sem gerðar eru á útreikningum, ef við á,

— mismunur á hlutfalli glúkósaörvaðrar öndunar í hundraðshlutum á hverjum sýnatökutíma eða, ef við á, EC_{50} með 95% öryggismörkum, önnur EC_x (þ.e. EC_{25} eða EC_{10}) með öryggismörkum og línurit sem sýnir skammtasvörunarferil,

— tölfræðileg úrvinnsla niðurstaðna, eftir því sem við á,

— allar upplýsingar og athuganir sem koma að gagni við túlkun niðurstaðna.

4. **HEIMILDIR**

1) EPPO, (1994) Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

2) BBA, (1990) Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

3) EPA, (1987) Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

4) SETAC-Europe, (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

5) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18- 20 January 1995.

6) ISO 10381-6, (1993) Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

7) Anderson, J.P.E., (1987) Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.

8) Anderson, J.P.E., (1982) Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831- 871.

9) ISO 11266-1, (1993) Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

10) ISO 14239, (1997E) Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

11) Heinemeye r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G., (1989) Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

12) ISO 14240-1, (1997) Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

13) ISO 14240-2, (1997) Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

14) Malkomes, H.-P., (1986) Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., (1949) A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

16) Finney, D.J., (1971) Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

17) Finney D.J., (1978) Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. **LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ UMMYNDUN Í JARÐVEGI**

1. **AÐFERÐ**

Þessi prófunaraðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 307 um prófanir (2002).

1.1. INNGANGUR

Þessi prófunaraðferð er byggð á fyrirliggjandi leiðbeiningum (1.–9. heimild). Prófunaraðferðin, sem er hér er lýst, er notuð við rannsóknir á loftháðri og loftfirrðri ummyndun á íðefnum í jarðvegi. Tilraunirnar eru gerðar til að ákvarða: i) ummyndunarhraða prófunarefnisins og ii) eðli og hraða á myndun og rýrnun ummyndunarefna sem geta valdið váhrifum fyrir plöntur og jarðvegslífverur. Slíkar rannsóknir eru nauðsynlegar þegar um er að ræða íðefni sem eru sett beint í jarðveginn eða sem er líklegt að berist í jarðveginn. Niðurstöður slíkra rannsókna á rannsóknarstofum geta enn fremur nýst til að þróa sýnatöku og aðferðarlýsingu fyrir greiningar við rannsóknir á öðrum skyldum sviðum.

Rannsóknir við loftháð og loftfirrð skilyrði með einni jarðvegsgerð nægja yfirleitt til þess að meta ummyndunarferlin (8., 10. og 11. heimild). Ákvarða skal ummyndunarhraða í a.m.k. þrenns konar jarðvegsgerðum til viðbótar (8. og 10. heimild).

Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgirate á Ítalíu árið 1995 (10. heimild), var gerð sérstök samþykkt um það hvaða gerðir jarðvegs og hve margar skyldi nota í þessari prófun. Jarðvegsgerðirnar, sem eru prófaðar, skulu vera dæmigerðar fyrir þær umhverfisaðstæður þar sem gert er ráð fyrir að efnið verði notað eða losað. Til dæmis skulu íðefni, sem kunna að verða losuð í hitabeltinu eða heittempruðu beltunum, prófuð með ferrasólum eða nítósólum (FAO-kerfi). Á vinnufundinum voru einnig settar fram ráðleggingar varðandi töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegssýna sem grundvallast á leiðbeiningum ISO (15. heimild). Í þessari aðferð er einnig fjallað um notkun jarðvegs af hrísgrjónaökrum.

1.2. SKILGREININGAR

Prófunarefni: hvaða efni sem er, hvort sem það er móðurefnið eða ummyndunarefni sem máli skipta.

Ummyndunarefni: efni sem myndast við lífræn eða ólífræn ummyndunarhvörf prófunarefnisins, þ.m.t. CO_2 og efni sem eru í bundnum efnaleifum.

Bundnar efnaleifar: efnasambönd í jarðvegi, plöntum eða dýrum sem haldast í efniviðinum í formi móðurefnis eða umbrots- eða ummyndunarefna þess eftir útdrátt. Útdráttaraðferðin má ekki leiða til verulegra breytinga á sjálfum efnasamböndunum eða gerð efniviðarins. Að hluta til er unnt að skýra hvers eðlis tengin (bindingin) eru með útdráttaraðferðum, sem breyta efniviðinum, og háþróaðri greiningartækni. Fram að þessu hefur t.d. á þennan hátt verið hægt að greina samgild tengi, jónísk tengi og sogtengi, svo og innlyksur. Yfirleitt dregur myndun bundinna efnaleifa verulega úr aðgengi fyrir lífverur (12. heimild) [breytt frá IUPAC 1984 (13. heimild)].

Loftháð ummyndun: efnahvörf sem verða í nálægð súrefnissameinda (14. heimild).

Loftfirrð ummyndun: efnahvörf sem verða án nálægðar súrefnissameinda (14. heimild).

Jarðvegur: blanda jarðefna og lífrænna efnisþátta; hinir síðarnefndu eru kolefnis- og köfnunarefnisauðug efnasambönd með mikilli sameindaþyngd, sem smáar lífverur (aðallega örverur) hrærast í. Jarðveg má meðhöndla í tvenns konar ásigkomulagi:

a) óhreyfðan, eins og hann hefur orðið í tímans rás, í dæmigerðum lögum af ýmsum jarðvegsgerðum,

b) hreyfðan, eins og hann er að jafnaði á ræktuðu landi eða eins og hann er þegar sýni eru tekin með greftri og notuð í þessari prófunaraðferð (14. heimild).

Sundrun: fullkomið niðurbrot lífrænna efnasambanda yfir í CO_2 og H_2O við loftháðar aðstæður og í CH_4, CO_2 og H_2O við loftfirrðar aðstæður. Að því er varðar þessa prófunaraðferð merkir sundrun umfangsmikið niðurbrot sem verður þegar efnasambönd, merkt með ^{14}C, eru notuð og merkt kolefnisatóm oxast og tilsvarandi magn losnar af $^{14}CO_2$ (14. heimild).

Helmingunartími: $t_{0,5}$, er sá tími sem 50% ummyndun prófunarefnis tekur þegar lýsa má ummynduninni með hraðafræði af fyrstu gráðu; hann er óháður styrknum.

DT50 (sundrunartími 50): sá tími sem líður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 50%; hann er frábrugðinn helmingunartímanum, $t_{0,5}$ ef ummyndunin verður ekki samkvæmt hraðafræði af fyrstu gráðu.

DT75 (sundrunartími 75): sá tími sem líður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 75%.

DT90 (sundrunartími 90): sá tími sem líður þar til styrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 90%.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni skulu notuð til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefnunum með aðferðum þar sem litrófsgreinir og litskilja eru notuð.

1.4. NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Þessi prófun er notuð fyrir öll efni (ómerkt eða geislamerkt) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Hana er hægt að nota fyrir lítillega rokgjörn, órokgjörn, vatnsleysanleg eða vatnsóleysanleg efnasambönd. Prófunin skal ekki gerð á íðefnum sem rjúka mjög úr jarðvegi (t.d. svæliefni og lífræn leysiefni) og erfitt er að halda í jarðveginum við tilraunaskilyrðin sem ríkja í þessari prófun.

1.5. UPPLÝSINGAR UM EFNIÐ

Nota má hvort sem er ómerkt eða merkt prófunarefni til að mæla ummyndunarhraðann. Nota verður merkt efni við rannsóknir á ummyndunarferlunum og við ákvörðun massajöfnuðar. Mælt er með ^{14}C-merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H og ^{32}P. Merkið skal, svo sem framast er kostur, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar (20. heimild)([1]). Hreinleiki prófunarefnisins skal vera a.m.k. 95%.

Áður en prófun er gerð á loftháðri og loftfirrðri ummyndun í jarðvegi skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

a) vatnsleysni (aðferð A.6),

b) leysni í lífrænum leysum,

c) gufuþrýstingur (aðferð A.4) og fasti samkvæmt lögmáli Henrys,

d) deilistuðull n-oktanóls/vatns (aðferð A.8),

e) efnafræðilegur stöðugleiki í myrkri (vatnsrof) (aðferð C.7),

f) pKa, ef líkur eru á róteindun eða afróteindun sameindar (OECD-leiðbeiningar 112) (16. heimild).

Aðrar gagnlegar upplýsingar geta t.d. verið gögn um eiturhrif prófunarefnisins á jarðvegsörverur (prófunaraðferð C.21 og C.22) (16. heimild).

Greiningaraðferðir (þ.m.t. útdráttur og hreinsiaðferðir) fyrir magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnisins og ummyndunarefnis þess skulu vera fyrir hendi.

([1]) Ef prófunarefnið inniheldur t.d. einn hring þarf að merkja þann hring; ef prófunarefnið inniheldur tvo eða fleiri hringi getur sérstök rannsókn verið nauðsynleg til að meta hvað verður um hvern merktan hring og til að fá nægar upplýsingar um myndun ummyndunarefna.

1.6. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Jarðvegssýni eru meðhöndluð með prófunarefninu og eru höfð í myrkri í lífmælingaflöskum eða í gegnumstreymiskerfi við stýrð skilyrði á rannsóknarstofu (stöðugt hitastig og jarðvegsraki). Eftir hæfilegan tíma eru jarðvegssýni dregin út og greind með tilliti til móðurefnisins og ummyndunarefna. Rokgjörnum efnum er einnig safnað til greiningar með hjálp viðeigandi ísogsbúnaðar. Ef notað er ^{14}C-merkt efni má mæla mismunandi sundrunarhraða prófunarefnisins með því að veiða það $^{14}CO_2$ sem myndast í gildru og ákvarða massajöfnuð, þ.m.t. myndun bundinna efnaleifa í jarðvegi.

1.7. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.7.1. **Endurheimt**

Útdráttur og greining á a.m.k. tveimur eins jarðvegssýnum strax eftir að prófunarefninu hefur verið bætt við gefur fyrstu vísbendingu um endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar og samræmi aðferðarinnar sem notuð er við ísetningu prófunarefnisins. Endurheimt fyrir síðari stig tilraunanna sést af viðkomandi massajöfnuði. Endurheimt skal vera 90–110% fyrir merkt íðefni (8. heimild) og 70–110% fyrir ómerkt íðefni (3. heimild).

1.7.2. **Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar**

Unnt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar við magngreiningu prófunarefnis og ummyndunarefna (að frátalinni upphaflegri skilvirkni í útdrætti) með tvöfaldri greiningu á sama jarðvegsútdrætti, sem er ræktaður svo lengi að ummyndunarefni myndist.

Greiningarmörk greiningaraðferðarinnar fyrir prófunarefnið og fyrir ummyndunarefnin skulu vera a.m.k. 0,01 mg · kg^{-1} af jarðvegi (sem prófunarefni) eða 1% af skammtinum sem er notaður, hvort sem er minna af þessu tvennu. Magngreiningarmörkin skulu einnig tilgreind.

1.7.3. **Nákvæmni ummyndunargagna**

Aðhvarfsgreining á styrk prófunarefnisins, sem fall af tíma, gefur fullnægjandi upplýsingar um áreiðanleika ummyndunarferilsins og gerir það kleift að reikna öryggismörkin fyrir helmingunartíma (þegar um er að ræða hraðafræði af sýndarfyrstu gráðu) eða DT_{50}-gildi og, ef við á, DT_{75}- og DT_{90}-gildi.

1.8. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.8.1. **Búnaður og prófefni**

Ræktunarkerfin eru lokuð sístöðukerfi eða heppileg gegnumstreymiskerfi (7. og 17. heimild). Dæmi um heppilegt gegnumstreymistæki fyrir ræktun jarðvegs og lífmælingaflösku eru sýnd á 1. og 2. mynd. Báðar gerðir ræktunarkerfanna hafa í senn kosti og galla (7. og 17. heimild).

Auk þess þarf venjulegan rannsóknarstofubúnað, einkum eftirfarandi:

— tæki til greiningar, s.s. búnaður til gasvökvagreininga (GLC), háþrýstivökvaskiljunar (HPLC) og þunnlagsskiljunar (TLC), þ.m.t. viðeigandi greinikerfi til að greina bæði geislamerkt og ómerkt efni eða aðferð með umsnúinni samsætuþynningu,

— tæki til sanngreiningar (t.d. til massagreininga (MS), gas- og massagreininga (GC-MS), háþrýstivökvaskiljunar og massagreininga (HPLC-MS), segulómunar (NMR) o.s.frv.),

— vökvasindurteljari,

— oxari til brennslu geislavirks efnis,

— skilvinda,

— útdráttarbúnaður (t.d. skilvinduglös fyrir kaldan útdrátt og Soxhlet-tæki fyrir samfelldan útdrátt við bakstreymi),

— tækjabúnaður til að þykkja lausnir og útdregna vökva (t.d. hverfieimir),

— vatnsbað,

— vélrænn blöndunarbúnaður (t.d. hnoðari eða snúningsblandari).

Prófefni, t.d.:

— NaOH, af greiningarhreinleika, 2 mól · dm^{-3}, eða annar heppilegur basi (t.d. KOH eða etanólamín),

— H2SO4, af greiningarhreinleika, 0,05 mól · dm^{-3},

— etýlenglýkól, af greiningarhreinleika,

— föst ísogsefni, s.s. tappar úr sódakalki og pólýúretani,

— lífrænir leysar (af greiningarhreinleika), s.s. aseton, metanól o.s.frv.,

— sindurteljaravökvi.

1.8.2. **Ísetning prófunarefnis**

Við ísetningu og dreifingu prófunarefnis í jarðveg má leysa það upp í vatni (afjónuðu eða eimuðu) eða, þegar nauðsyn krefur, í minnsta magni af asetoni eða öðrum lífrænum leysi (6. heimild) þar sem prófunarefnið er nægilega uppleyst og stöðugt. Magn leysisins, sem notaður er, skal þó ekki hafa veruleg áhrif á virkni örvera í jarðvegi (sjá liði 1.5 og 1.9.2–1.9.3). Forðast skal að nota leysa sem hindra virkni örvera, s.s. klóróform, díklórmetan og aðra halógenaða leysa.

Einnig má setja prófunarefnið í sem fast efni, t.d. blandað í kvarssand (6. heimild) eða í lítil undirsýni úr prófunarjarðveginum sem hafa verið loftþurrkuð og dauðhreinsuð. Ef prófunarefninu er bætt í sem uppleystu efni skal láta leysinn gufa upp áður en undirsýnið, sem efnið er sett í, er sett saman við upphaflega jarðvegssýnið sem hefur ekki verið dauðhreinsað.

Þegar um er að ræða venjuleg íðefni sem berast aðallega í jarðveginn með skólpseyru eða vegna notkunar í landbúnaði skal fyrst bæta prófunarefninu í seyruna sem síðan er sett í jarðvegssýnið. (sjá liði 1.9.2 og 1.9.3)

Ekki er mælt er með því að samsettar vörur séu notaðar að staðaldri. Ef prófunarefnið er torleysanlegt getur þó verið heppilegur kostur að nota samsett efni.

1.8.3. **Jarðvegur**

1.8.3.1. *Val á jarðvegi*

Við ákvörðun á ummyndunarferli má nota dæmigerðan jarðveg; sendna mold, siltmold, mold eða myldinn sand (samkvæmt flokkun FAO og USDA (18. heimild)), með pH-gildi 5,5–8,0, innihald lífræns kolefnis 0,5–2,5% og mælt er með því að lífmassi örvera sé a.m.k. 1% af heildarmagni lífræns kolefnis (10. heimild).

Við rannsóknir á ummyndunarhraða skal nota a.m.k. þrenns konar viðeigandi jarðvegsgerðir. Þessar jarðvegsgerðir skulu vera mismunandi að því er varðar innihald lífræns kolefnis, sýrustig, leirinnihald og lífmassa örvera (10. heimild).

Greina skal allan jarðveg, a.m.k. með tilliti til kornastærðar (hundraðshlutar sands, silts og leirs) [samkvæmt flokkun FAO og USDA (18. heimild)], sýrustigs, plúsjónaskiptagetu, lífræns kolefnis, þéttleika lausa jarðvegsins, vatnsheldnieiginleika ([1]) og lífmassa örvera (aðeins fyrir rannsóknir við loftháð skilyrði). Viðbótarupplýsingar um eiginleika jarðvegs geta verið gagnlegar við túlkun niðurstaðna. Við ákvörðun á eiginleikum jarðvegsins má nota aðferðirnar sem mælt er með í 19., 20., 21., 22. og 23. heimild. Ákvarða skal lífmassa örvera með aðferð þar sem öndunin er örvuð með æti (SIR) (25. og 26. heimild) eða staðgönguaðferðum (20. heimild).

([1]) Vatnsheldnieiginleika jarðvegs má mæla sem rakarýmd lands, sem vatnsheldni eða sem sogspennu (pF). Sjá skýringar í 1. viðbæti. Í prófunarskýrslunni er rétt að láta það koma fram hvort vatnsheldnieiginleikar og þéttleiki jarðvegsins í lausu hafi verið ákvarðaðir í sýnum af óhreyfðu landi eða sýnum af hreyfðu landi.

1.8.3.2. *Taka sýna úr jarðvegi, meðhöndlum og geymsla*

Nákvæmar upplýsingar eiga að vera tiltækar um sögu staðarins þar sem prófunarjarðvegurinn er tekinn. Upplýsingarnar skulu varða nákvæma staðsetningu, gróðurþekju, meðhöndlun með íðefnum, meðhöndlun með lífrænum og ólífrænum áburði, viðbætur lífrænna efna eða mengun. Hafi jarðvegurinn verið meðhöndlaður með prófunarefni eða efnum með hliðstæðri byggingu undanfarin fjögur ár skal ekki nota hann við rannsóknir á ummyndun (10. og 15. heimild).

Jarðvegssýnin skulu vera nýtekin af landinu (úr efsta jarðvegslaginu eða laginu í efstu 20 cm) með vatnsinnihaldi sem hentar fyrir sigtun. Þegar um er að ræða annan jarðveg en af hrísgrjónaökrum skal forðast að taka sýni á langvarandi tímabili þurrka, frosts eða flóða (lengri en 30 daga) eða strax í kjölfar slíkra tímabila (14. heimild). Sýnin skulu flutt á þann hátt að breytingar á vatnsinnihaldi jarðvegsins séu í lágmarki og skulu höfð í myrkri þar sem loft leikur um þau, svo sem framast er kostur. Pólýetýlenpoki, lauslega lokaður, nægir venjulega til að ná þessu markmiði.

Jarðvegurinn skal meðhöndlaður svo fljótt sem unnt er eftir sýnatökuna. Fjarlægja skal gróður og stærstu jarðvegslífverur og steina áður en jarðvegurinn er settur gegnum 2 mm sigti sem síar frá smásteina, dýr og plöntuleifar. Forðast skal að þurrka og mylja jarðveginn um of áður en hann er sigtaður (15. heimild).

Ef erfitt er að ná jarðvegssýnum að vetrarlagi (jarðvegur er frosinn eða undir snjó) kann að vera hægt að ná þeim úr jarðvegi undir gróðurþekju (t.d. undir grasi eða grasi og smára) sem hefur verið geymdur í gróðurhúsi. Eindregið er mælt með því að við rannsóknirnar sé notaður jarðvegur, sem er nýtekinn af landinu, en ef geyma þarf meðhöndluð sýni áður en rannsókn hefst verða skilyrði til geymslu að vera fullnægjandi og geymslutíminn takmarkaður (við 4 ±2 °C í þrjá mánuði að hámarki) til að viðhalda virkni örvera ([1]). Nákvæmar leiðbeiningar um töku, meðhöndlun og geymslu jarðvegs, sem nota á í tilraunir á lífummyndun, er að finna í 8., 10., 15., 26. og 27. heimild.

Áður en meðhöndlaður jarðvegur er notaður í þessari prófun þarf að forrækta hann svo að spírun geti átt sér stað og fjarlægja megi fræ og til að ná aftur jafnvægi í efnaskiptum örvera eftir þá breytingu á skilyrðum sem verður frá sýnatöku eða geymslu og þar til ræktunin fer fram. Venjulega nægir 2–28 daga forræktunartímabil þar sem hita- og rakaskilyrði eru höfð svipuð og í sjálfri prófuninni (15. heimild). Samanlagður geymslu- og forræktunartími skal ekki fara yfir þrjá mánuði.

1.9. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.9.1. **Prófunarskilyrði**

1.9.1.1. *Prófunarhitastig*

Allan prófunartímann skal jarðvegurinn ræktaður í myrkri við stöðugt hitastig sem er dæmigert fyrir þau loftslagsskilyrði þar sem notkun eða losun fer fram. Mælt er með hitastiginu 20 ±2 °C fyrir öll prófunarefni sem geta borist í jarðveginn í tempruðu loftslagi. Vakta skal hitastigið.

Þegar um er að ræða íðefni sem eru sett í eða losuð í kaldara loftslagi (t.d. í norðlægum löndum um haust/vetur) skal rækta önnur jarðvegssýni til viðbótar við lægra hitastig (t.d. 10 ±2 °C).

1.9.1.2. *Rakainnihald*

Við ummyndunarprófun við loftháðar aðstæður skal rakainnihald jarðvegsins ([2]) jafnað og haldið við pF-gildi á bilinu 2,0 til 2,5 (3. heimild). Rakainnihald jarðvegs er tilgreint sem massi vatns á móti massa af þurrum jarðvegi og skal athugað reglulega (t.d. með tveggja vikna millibili) með því að vigta ræktunarflöskurnar og vatnið sem er sett í til að bæta upp vatnstap (helst kranavatn dauðhreinsað með síun). Gæta skal þess að hindra eða halda í lágmarki tapi á prófunarefni og/eða ummyndunarefnum vegna uppgufunar og/eða ljóssundrunar (ef um hana er að ræða) meðan vatni er bætt við.

Við ummyndunarprófun við loftfirrðar aðstæður og skilyrði, sem ríkja við hrísgrjónarækt, er jarðvegurinn mettaður af vatni með því að láta flæða yfir hann.

([1]) Nýlegar rannsóknarniðurstöður benda til þess að einnig megi geyma jarðveg frá tempruðu beltunum við -20 °C í meira en þrjá mánuði (28. og 29. heimild) án þess að starfsemi örvera skerðist verulega.

([2]) Jarðvegurinn skal hvorki vera of rakur né of þurr þannig að halda megi hæfilegri loftun og næringu fyrir örflóru í jarðvegi. Til að ná mesta örveruvexti er mælt með rakainnihaldi sem er 40–60% af vatnsheldninni (WHC) og 0,1–0,33 bör (6. heimild). Hið síðarnefnda jafngildir pF-bilinu 2,0–2,5. Dæmigert rakainnihald ýmissa jarðvegsgerða er tilgreint í 2. viðbæti.

1.9.1.3. *Skilyrði við loftháða ræktun*

Í gegnumstreymiskerfum er loftháðum aðstæðum viðhaldið með ósamfelldri skolun eða með stöðugri loftræstingu með rakabættu lofti. Í lífmælingaflöskunum er loftskiptum viðhaldið með flæði.

1.9.1.4. *Dauðhreinsaðar loftháðar aðstæður*

Til að fá upplýsingar um mikilvægi ummyndunar prófunarefnis sem verður án tilstillis lífvera má dauðhreinsa jarðvegssýni (sjá nánar um dauðhreinsunaraðferðir í 16. og 29. heimild), meðhöndla þau með dauðhreinsuðu prófunarefni (t.d. þannig að lausnin er látin fara gegnum dauðhreinsunarsíu) og lofta með rakabættu, dauðhreinsuðu lofti eins og lýst er í lið 1.9.1.3. Þegar um er að ræða jarðveg af hrísgrjónaakri skal dauðhreinsa jarðveginn og vatnið og ræktunin skal fara fram eins og lýst er í lið 1.9.1.6.

1.9.1.5. *Skilyrði við loftfirrða ræktun*

Til að koma á og viðhalda loftfirrðum aðstæðum er jarðvegur, sem hefur verið meðhöndlaður með prófunarefninu og ræktaður við loftháðar aðstæður í 30 daga, einn helmingunartíma eða DT50 (eftir því hvert tímabilanna er styst), og síðan er hann vatnsmettaður (hafður undir 1–3 cm vatnslagi) og ræktunarkerfið skolað með hvarftregri lofttegund (t.d. köfnunarefni eða argoni) ([1]). Prófunarkerfið verður að vera þannig að koma megi við mælingum, s.s. á sýrustigi, súrefnisstyrk og afoxunar-/oxunarmætti og það skal vera með gildrubúnaði fyrir rokgjörn efni. Lífmælingakerfið verður að vera lokað til að varna því að loft berist inn með flæði.

1.9.1.6. *Skilyrði við ræktun jarðvegs af hrísgrjónaökrum*

Til að rannsaka ummyndun í jarðvegi af hrísgrjónaökrum er jarðvegurinn kaffærður með vatni svo að 1–5 cm lag fljóti yfir og prófunarefnið sett í vatnsfasann (9. heimild). Mælt er með a.m.k. 5 cm jarðvegsdýpt. Kerfið er loftræst eins og við loftháðar aðstæður. Fylgjast skal með og skrá sýrustig, súrefnisstyrk og afoxunar-/oxunarmætti vatnsfasans. Forræktun í a.m.k. tvær vikur er nauðsynleg áður en rannsóknir á ummyndun hefjast (sjá lið 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Lengd prófunar*

Rannsóknir á hraða og ferli skulu venjulega ekki vera lengri en 120 dagar ([2]) (3., 6. og 8. heimild), sökum þess að eftir það má búast við því að virkni örvera í jarðveginum minnki með tímanum í tilbúnu rannsóknarstofukerfi sem er einangrað frá náttúrulegri endurnýjun. Ef nauðsynlegt er að lýsa minnkun prófunarefnisins og myndun og minnkun helstu ummyndunarefnanna geta rannsóknirnar staðið yfir lengur (t.d. 6 eða 12 mánuði) (8. heimild). Færa skal rök fyrir lengdum ræktunartímabilum í prófunarskýrslunni og gera þá grein fyrir mælingum á lífmassa meðan á ræktun stendur og við lok ræktunartímabilanna.

1.9.2. **Framkvæmd prófunarinnar**

Um 50 til 200 g af jarðvegi (þurrvigt) eru sett í hverja ræktunarflösku (sjá 1. og 2. mynd í 3. viðbæti) og jarðvegurinn meðhöndlaður með prófunarefninu með einni af aðferðunum sem lýst er í lið 1.8.2. Ef lífrænir leysar eru notaðir við ísetningu prófunarefnisins skal láta þá gufa upp úr jarðveginum. Síðan er jarðveginum blandað vandlega með því að hræra í honum með spaða og/eða með því að hrista flöskuna. Ef rannsóknin fer fram við skilyrði sem ríkja við hrísgrjónarækt skal blanda jarðvegi og vatni vandlega saman eftir ísetningu prófunarefnisins. Greina skal lítinn deiliskammt (t.d. 1 g) af meðhöndlaða jarðveginum með tilliti til prófunarefnisins til að ganga úr skugga um að dreifingin sé jöfn. Staðgönguaðferð er lýst hér á eftir.

Meðhöndlunarhlutfall skal samsvara stærsta skammti af plöntuverndarvöru sem mælt er með í notkunarleiðbeiningum og efnið skal dreifast jafnt niður á hæfilegt dýpi á landinu (t.d. í efstu 10 cm af jarðveginum) ([3]). Til dæmis, fyrir íðefni sem borin eru á gróður eða dreift á jarðveg án ísetningar, er viðeigandi dýpt fyrir útreikning á hve miklu íðefni skuli bæta í hverja flösku 2,5 cm. Fyrir íðefni sem er blandað við jarðveg er viðeigandi dýpt ísetningardýptin sem tilgreind er í notkunarleiðbeiningunum. Fyrir almenn íðefni skal áætla umfang notkunar út frá þeirri íkomuleið sem mest vægi hefur; ef helsta

([1]) Loftháðar aðstæður eru ríkjandi í yfirborðsjarðvegi og einnig í jarðveginum undir yfirborðinu eins og kemur fram í rannsóknarverkefni sem styrkt er af ESB [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Loftfirrð skilyrði geta aðeins skapast stöku sinnum þegar land flæðir eftir mikla rigningu eða þegar skilyrði sem ríkja við hrísgrjónarækt eru sköpuð á hrísgrjónaökrum.

([2]) Rannsóknir á loftháðum skilyrðum kunna að taka mun skemmri tíma en 120 daga að því tilskildu að endanlegum ummyndunarferlum og endanlegri sundrun sé greinilega lokið á þeim tíma. Hægt er að ljúka prófuninni eftir 120 daga eða þegar a.m.k. 90% af prófunarefninu hefur ummyndast en þó því aðeins að a.m.k. 5% CO_2 hafi myndast.

([3]) Calculation of the initial concentration on an area basis using the following equation:

$$C_{jarðvegur}\ [mg/kg_{jarðvegur}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6\ [mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4\ [m^2/ha] \cdot d\ [kg_{jarðvegur}/m^3]}$$

$C_{jarðvegur}$ = upphafsstyrkur í jarðvegi [mg·kg^{-1}]

A = skammtur [kg· ha^{-1}]; 1 = þykkt jarðvegslagsins á svæðinu [m]; d = þéttleiki í lausum, þurrum jarðvegi [kg· m^{-3}].Almennt gildir að skömmtunin 1 kg·ha^{-1} gefur jarðvegsstyrk sem er um það bil 1 mg kg^{-1} í 10 cm lagi (miðað við að þéttleiki þurra jarðvegsins í lausu sé 1 g·cm^{-3})

íkomuleiðin í jarðveginn er t.d. með skólpseyru skal skammta íðefnið í seyruna í þeim styrk sem endurspeglar styrkinn sem vænta má að sé í seyrunni og magn skólpseyrunnar, sem er bætt í jarðveginn, skal svara til þess magns sem venjulega er borið á í landbúnaði. Ef þessi styrkur er ekki svo mikill að hægt sé að greina helstu ummyndunarefnin getur ræktun sérstakra jarðvegssýna með meiri styrk komið að gagni en forðast skal að nota mjög mikinn styrkleika sem hefur áhrif á starfsemi örvera í jarðveginum (sjá liði 1.5 og 1.8.2).

Þá má einnig taka meira af jarðvegi (þ.e. 1 til 2 kg) og meðhöndla með prófunarefninu, vandlega blönduðu í viðeigandi blöndunarbúnaði, og flytja síðan í minni skömmtum, 50 til 200 g, í ræktunarflöskurnar (t.d. með búnaði til að skipta sýnum). Greina skal lítin deiliskammt (t.d. 1 g) af meðhöndlaða jarðveginum með tilliti til prófunarefnisins til að ganga úr skugga um að dreifingin sé jöfn. Mælt er með þessari aðferð vegna þess að með henni er unnt að dreifa prófunarefninu jafnar í jarðveginum.

Ómeðhöndluð jarðvegssýni eru einnig ræktuð við sömu aðstæður (loftháðar) og sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu. Þessi sýni eru notuð við mælingu á lífmassa meðan á rannsókn stendur og við lok hennar.

Ef prófunarefnið er leyst upp í lífrænum leysi eða leysum og sett þannig í jarðveginn eru jarðvegssýnin, sem eru meðhöndluð með sama magni leysis eða leysa, ræktuð við sömu aðstæður (loftháðar) og sýnin sem eru meðhöndluð með prófunarefninu. Þessi sýni eru notuð við mælingu á lífmassa í upphafi, meðan á rannsókn stendur og við lok hennar til að kanna áhrif leysisins eða leysanna á lífmassa örvera.

Flöskurnar, sem innihalda meðhöndlaðan jarðveg, eru annaðhvort tengdar gegnumstreymiskerfinu, sem lýst er á 1. mynd, eða þeim er lokað með ísogssúlu sem er sýnd á 2. mynd (sjá 3. viðbæti).

1.9.3. **Sýnataka og mælingar**

Par ræktunarflaskna er tekið með hæfilegu millibili og jarðvegssýnin dregin út með viðeigandi leysum með mismunandi skautun og efnagreind með tilliti til prófunarefnisins og/eða ummyndunarefna. Í vel útfærðri rannsókn skulu vera svo margar flöskur að unnt sé að taka tvær flöskur úr kerfinu í hverju tilviki þar sem sýni eru tekin. Þá eru ísogslausnir eða föst ísogsefni fjarlægð með mismunandi millibili (með 7 daga millibili fyrsta mánuðinn og eftir það með 17 daga millibili) meðan á ræktun stendur og við lok hennar fyrir hvert jarðvegssýni og efnagreind með tilliti til rokgjarnra efna. Auk jarðvegssýna, sem eru tekin strax eftir ísetningu efnis (sýni tekið á degi 0), skal taka a.m.k. sýni í fimm tilvikum til viðbótar í prófuninni. Velja skal tímabilin þannig að hægt sé að ákvarða mynstur minnkunar prófunarefnisins og mynstur myndunar og minnkunar ummyndunarefna (t.d. 0, 1, 3, 7 dagar; 2, 3 vikur; 1, 2, 3 mánuðir, o.s.frv.).

Þegar prófunarefni, merkt með 14C, er notað er óútdraganleg geislavirkni magngreind með bruna og massajöfnuður er reiknaður út fyrir hvert bil milli sýnataka.

Þegar um er að ræða loftfirrða ræktun og ræktun jarðvegs af hrísgrjónaökrum eru jarðvegs- og vatnsfasar greindir saman með tilliti til prófunarefnisins og ummyndunarefna eða þeir eru aðskildir með síun eða skiljun áður en kemur að útdrætti og greiningu.

1.9.4. **Valfrjálsar prófanir**

Gagnlegt getur verið að gera frekari rannsóknir við loftháð skilyrði þar sem dauðhreinsun er ekki beitt, en við annan hita og jarðvegsraka til viðbótar, til að ákvarða áhrif hita og raka í jarðvegi á ummyndunarhraða prófunarefnisins og/eða ummyndunarefni þess í jarðveginum.

Reyna má að fá frekari vitneskju um óútdraganlega geislavirkni, t.d. með því að beita vökvaútdrætti yfir marki.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Gefa skal upp magn prófunarefnis, ummyndunarefna, rokgjarnra efna (aðeins í %) og óútdraganlegra efna sem hundraðshluta af upphafsstyrk viðbætta efnisins og, ef við á, sem $mg \cdot kg^{-1}$ af jarðvegi (þurrvigt) fyrir hvert sýnatökumillibil. Massajöfnuður skal gefinn upp í hundraðshlutum upphaflegs styrks viðbætta efnisins fyrir hvert sýnatökumillibil.

Ef styrkur prófunarefnisins er settur á fram myndrænt á móti tíma er unnt að ákvarða helmingunartímann fyrir ummyndun prófunarefnisins eða DT50. Sanngreina skal helstu ummyndunarefnin og einnig skal teikna línurit af styrk þeirra á móti tíma til að sýna hve hratt þau myndast og minnka. Helstu ummyndunarefni eru þau efni sem eru ≥ 10% af notuðum skammti hvenær sem er meðan á rannsókninni stendur.

Rokgjörnu efnin, sem hafa verið fönguð í gildru, gefa nokkra vísbendingu um rokgirni prófunarefnisins og ummyndunarefna þess í jarðvegi.

Nákvæmari ákvarðanir á helmingunartíma eða DT50-gildum og, ef við á DT75- og DT90-gildum, skulu gerðar með viðeigandi útreikningum með hraðafræðilegum reiknilíkönum. Greina skal frá helmingunartíma og DT50-gildum ásamt lýsingu á líkaninu sem er notað, hraðafræðilegri gráðu og ákvörðunarstuðli (r^2). Gera skal ráð fyrir hraðafræði af fyrstu gráðu nema ef $r^2 < 0,7$. Ef við á skal einnig ákvarða helstu ummyndunarefnin með útreikningum. Dæmum um viðeigandi líkön er lýst í 31.–35. heimild.

Ef um er að ræða rannsóknir sem framkvæmdar eru við mismunandi hitastig skal lýsa ummyndunarhraðanum sem falli af hitastigi við hitasvið tilraunarinnar og nota Arrhenius-vensl samkvæmt eftirfarandi formúlu:

$$K = A \cdot e^{-B/T} \text{ eða } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

þar sem ln A og B eru aðhvarfsstuðlar, fengnir annars vegar út frá skurðpunkti og hins vegar út frá halla best aðlöguðu línu sem fæst með línulega aðhvarfinu ln k á móti 1/T, k er hraðafastinn við hitastigið T og T er hitastig á Kelvin. Gæta skal að því að Arrhenius-vensl eru aðeins gild á takmörkuðu hitasviði við aðstæður þar sem ummyndunin ræðst af starfsemi örvera.

2.2. MAT OG TÚLKUN Á NIÐURSTÖÐUM

Þó að rannsóknirnar fari fram í tilbúnu rannsóknarstofukerfi geta niðurstöðurnar þó gert það kleift að ákvarða ummyndunarhraða prófunarefnisins og einnig myndunar- og minnkunarhraða ummyndunarefna við þau skilyrði sem ríkja á viðkomandi landi (36. og 37. heimild).

Rannsókn á ummyndunarleið prófunarefnis veitir upplýsingar um á hvern hátt bygging ísetts efnis breytist í jarðveginum með efnahvörfum og hvörfum af völdum örvera.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

PRÓFUNARSKÝRSLA

Í prófunarskýrslunni skal koma fram:

Prófunarefni:

— almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla (þ.m.t. staðsetning merkis eða merkja ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegir eiginleikar sem skipta máli (sjá lið 1.5),

— hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,

— geislaefnafræðilegur hreinleiki merktra íðefna og sérstök virkni (ef við á).

Viðmiðunarefni:

— efnaheiti og bygging viðmiðunarefnisins sem er notað til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefninu.

Prófunarjarðvegur:

— nákvæm lýsing á staðnum,

— dagsetning og aðferð við sýnatöku,

— eiginleikar jarðvegsins, s.s. sýrustig, innihald lífræns kolefnis, kornastærð (hundraðshlutar sands, silts og leirs), plúsjónaskiptageta, þéttleiki lausa jarðvegsins, vatnsheldnieiginleikar og lífmassi örvera,

— hve lengi jarðvegurinn hefur verið geymdur og (ef svo er) geymsluskilyrði.

Prófunarskilyrði:

— dagsetningar rannsókna,

— ísett magn prófunarefnisins,

— leysar, sem eru notaðir, og aðferð við notkun prófunarefnisins,

— þyngd jarðvegs sem er meðhöndlaður í upphafi og allra sýna sem eru tekin á hverju bili til greiningar,

— lýsing á ræktunarkerfinu sem er notað,

— hraði loftstreymi (aðeins fyrir gegnumstreymiskerfi),

— hitastig í prófununum,

— rakainnihald jarðvegs við ræktun,

— lífmassi örvera í upphafi, meðan rannsókn stendur og við lok rannsóknar við loftháð skilyrði,

— sýrustig, súrefnisstyrkur og afoxunar-/oxunarmáttur í upphafi, meðan rannsókn stendur og við lok rannsóknar við loftfirrð skilyrði og í rannsókn á jarðvegi af hrísgrjónaökrum,

— aðferð, eða aðferðir, við útdrátt,

— aðferðir við magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnis og helstu ummyndunarefna í jarðvegi og í ísogsefnum,

— fjöldi samhliða prófana og fjöldi samanburðarsýna.

Niðurstöður:

— niðurstöður ákvörðunar á virkni örvera,

— endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðanna sem eru notaðar,

— endurheimtarhlutföll (gildi í % fyrir gilda rannsókn eru gefin upp í lið 1.7.1),

— töflur með niðurstöðum, sem gefnar eru upp sem % af notuðum, upphaflegum skammti og, ef við á, sem $mg \cdot kg^{-1}$ af jarðvegi (þurrvigt),

— massajöfnuður í rannsóknunum og við lok þeirra,

— lýsing á óútdraganlegri (bundinni) geislavirkni eða efnaleifum í jarðvegi,

— magngreining á því CO_2, sem losnar, og á rokgjörnum efnasamböndum,

— línurit sem sýnir styrk prófunarefnisins í jarðvegi á móti tíma, svo og, ef við á, einnig fyrir helstu ummyndunarefni,

— helmingunartími prófunarefnisins eða DT_{50}, DT_{75} og DT_{90} og, ef við á, fyrir helstu ummyndunarefni, þ.m.t. öryggismörk,

— mat á hraða niðurbrots án tilstillis lífvera við dauðhreinsaðar aðstæður,

— mat á ummyndunarhraða prófunarefnisins og, ef við á, helstu ummyndunarefna,

— ætluð ummyndunarferli, eftir því sem við á,

— umræða og túlkun niðurstaðna,

— óunnin gögn (þ.e. skiljurit fyrir sýni, útreikningar á ummyndunarhraða sýna og aðferðir til að sanngreina ummyndunarefni).

4. **HEIMILDIR**

1) US — Environmental Protection Agency, (1982) Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

2) Agriculture Canada, (1987) Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

3) Evrópusambandið (ESB), (1995) Tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 95/36/EB frá 14. júlí 1995 um breytingu á tilskipun ráðsins 91/414/EBE um markaðssetningu plöntuvarnarefna. A-hluti II. viðauka og A-hluti III. viðauka: Afdrif og hegðun í umhverfinu.

4) Dutch Commission for Registration of Pesticides, (1995) Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

5) BBA, (1986) Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

6) ISO/DIS 11266-1, (1994) Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

7) ISO 14239, (1997) Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralisation of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

8) SETAC, (1995) Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

10) OECD, (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18- 20 January 1995.

11) Guth, J.A., (1980) The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, bls. 123-157.

12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

15) ISO 10381-6 (1993) Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

16) V. viðbætir við tilskipun 67/548/EBE.

17) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

19) Methods of Soil Analysis (1986) Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

20) Methods of Soil Analysis (1982) Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

21) ISO Standard Compendium Environment (1994) Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

22) Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

23) Scheffer, F., Schachtschabel, P., (1975) Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, bls. 215-221.

25) ISO 14240-1 and 2 (1997) Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

26) Anderson, J.P.E., (1987) Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

27) Kato, Yasuhiro. (1998) Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, bls. 105-120.

28) Keuken O., Anderson J.P.E., (1996) Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996) Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R., (1987) Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, bls. 197-200.

31) Anderson, J.P.E. (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, bls. 141-146.

32) Hamaker, J.W., (1976) The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, bls. 181-199.

33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W., (1975) Principles of pesticide degradation in soil. In "Environmental Dynamics of Pesticides". R. Haque and V.H. Freed, Eds., bls. 135-172.

34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V., (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, bls. 188-204.

35) Timme, G., Frehse, H., (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, bls. 47-60.

36) Gustafson D.I., Holden L.R., (1990) Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, bls. 1032-1041.

37) Hurle K., Walker A., (1980) Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, bls. 83-122.

1. viðbætir

SOGSPENNA (WATER TENSION), RAKARÝMD LANDS (FC) OG VATNSHELDNI (WHC) ([1])

Hæð vatnssúlu (cm)	pF ([a])	bör ([b])	Athugasemdir
10^7	7	10^4	Þurr jarðvegur
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Visnunarmörk
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2,8	0,6	
$3{,}3 \cdot 10^2$	2,5	0,33 ([c])	
10^2	2	0,1	Svið fyrir rakarýmd lands ([d])
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	Vatnsheldni (WHC) (nálgun)
1	0	0,001	Vatnsmettaður jarðvegur

([a]) p^F = logri af vatnssúlu í cm.
([b]) 1 bar = 10^5 Pa.
([c]) Samsvarar nálægt 10% vatnsinnihaldi í sandi, 35% í mold og 45% í leir.
([d]) Rakarýmd lands er ekki stöðug heldur breytist hún eftir jarðvegsgerð og er frá pF 1,5 til 2,5.

Sogspenna er mæld sem lengd vatnssúlu í cm eða í börum. Vegna þess hve sogspenna spannar vítt svið er hún einfaldlega gefin upp sem pF-gildi sem jafngildir logranum af lengd vatnssúlu í cm.

Rakarýmd lands er skilgreind sem það magn vatns sem náttúrulegur jarðvegur getur haldið móti þyngdaraflinu tveimur dögum eftir langt regntímabil eða eftir nægilega vökvun. Hún er ákvörðuð á staðnum á óhreyfðu landi. Mælingin gildir því ekki fyrir sýni á rannsóknarstofu úr hreyfðum jarðvegi. Verulegur, kerfisbundinn munur í dreifni getur komið fram í FC-gildum sem eru ákvörðuð í hreyfðum jarðvegi.

Vatnsheldni (WHC) er ákvörðuð á rannsóknarstofu í óhreyfðum og hreyfðum jarðvegi með því að metta jarðvegssúlu af vatni með hárpípukrafti. Þetta er einkum gagnlegt þegar um er að ræða hreyfðan jarðveg og vatnsheldnin getur orðið allt að 30% meiri en rakarýmd lands (1. heimild). Í tilraunum er enn fremur auðveldara að ákvarða hana en áreiðanleg FC-gildi.

Athugasemdir

([1]) Mückenhausen, E., (1975) Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

2. viðbætir

RAKAINNIHALD JARÐVEGS (g vatns í 100 g af þurrum jarðvegi) Í MISMUNANDI JARÐVEGSGERÐUM FRÁ ÝMSUM LÖNDUM

Jarðvegsgerð	Land	Rakainnihald		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Sandur	Þýskaland	28,7	8,8	3,9
Myldinn sandur	Þýskaland	50,4	17,9	12,1
Myldinn sandur	Sviss	44,0	35,3	9,2
Siltmold	Sviss	72,8	56,6	28,4
Leirmold	Brasilía	69,7	38,4	27,3
Leirmold	Japan	74,4	57,8	31,4
Sendin mold	Japan	82,4	59,2	36,0
Siltmold	Bandaríkin	47,2	33,2	18,8
Sendin mold	Bandaríkin	40,4	25,2	13,3

(1) Vatnsheldni.

3. viðbætir

Mynd 1

Dæmi um gegnumstreymistæki fyrir rannsóknir á ummyndun íðefna í jarðvegi ((1). og (2). heimild)

1: nálarloki

2: gasþvottaflaska með vatni í

3: himnusía (aðeins við dauðhreinsaðar aðstæður), opstærð 0,2 µm

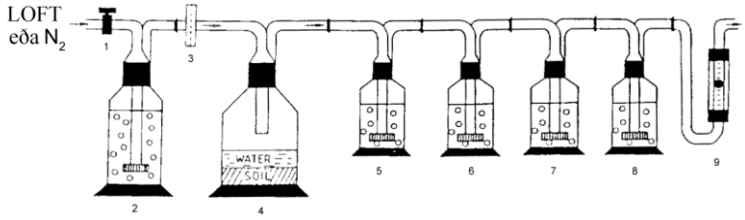
4: flaska fyrir efnaskipti í jarðvegi (aðeins vatnsmettaður fyrir loftfirrð skilyrði og skilyrði sem ríkja við hrísgrjónarækt),

5: etýlenglýkólgildra fyrir lífræn, rokgjörn efnasambönd,

6: brennisteinssýrugildra fyrir basísk, rokgjörn efnasambönd

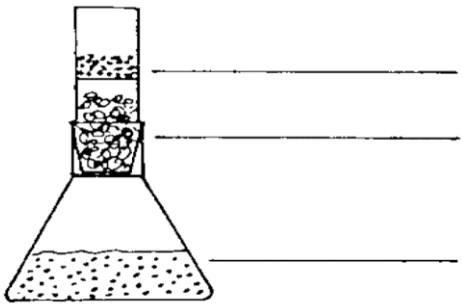
7, 8: natríumhýdroxíðgildra fyrir CO_2 og önnur súr, rokgjörn efni,

9: rennslismælir.



Mynd 2

Dæmi um lífmælingaflösku fyrir rannsóknir á ummyndun íðefna í jarðvegi ((3). heimild)



———

(1) Guth, J.A., (1980) The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, bls. 123-157.

(2) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, bls. 85-114.

(3) Anderson, J.P.E., (1975) Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, bls. 141-146.

C.24. LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ UMMYNDUN Í VATNASETKERFUM

1. AÐFERÐ

Þessi prófunaraðferð er sú sama og í OECD-viðmiðunarreglu 308 um prófanir (2002).

1.1. INNGANGUR

Komuleiðir íðefna í grunnt eða djúpt yfirborðsvatn geta t.d. verið bein ísetning, úði, afrennsli, framræsla, förgun úrgangs, frárennsli frá iðnaði, heimilum eða landbúnaði og ákoma úr andrúmsloftinu. Þessi prófunaraðferð er lýsing á rannsóknarstofuaðferð til að meta loftháða og loftfirrða ummyndun lífrænna íðefna í vatnasetkerfum. Hún er byggð á fyrirliggjandi leiðbeiningum (1.–6. heimild). Á vinnufundi Efnahags- og framfarastofnunarinnar (OECD) um val á jarðvegi eða seti, sem haldinn var í Belgirate á Ítalíu árið 1995 (7. heimild), var gerð sérstök samþykkt um það hve mörg setlög og hvaða gerðir þeirra skyldi nota í þessari prófun. Þar voru einnig settar fram ráðleggingar varðandi töku, meðhöndlun og geymslu sýna úr seti, sem grundvallast á leiðbeiningum ISO (8. heimild). Slíkar rannsóknir eru nauðsynlegar vegna íðefna sem eru sett beint í vatn eða sem er líklegt að berist út í vatn eftir þeim leiðum sem lýst var hér að framan.

Í náttúrulegum vatnasetkerfum eru oft loftháðar aðstæður í vatnsfasanum efst. Í yfirborðslagi setsins geta skilyrði hvort heldur verið loftháð eða loftfirrð en neðar í setinu eru þau venjulega loftfirrð. Með hliðsjón af þessu er því í þessu skjali lýst prófunum bæði við loftháð og loftfirrð skilyrði. Í loftháðu prófuninni er líkt eftir loftháðri vatnssúlu yfir loftháðu setlagi og þar undir er stigull með loftfirrðum skilyrðum. Í prófun við loftfirrð skilyrði er líkt eftir algerlega loftfirrðu kerfi vatns og sets. Ef aðstæður krefjast þess að vikið sé verulega frá þessum leiðbeiningum, t.d. með því að nota ósnerta setkjarna eða set sem kann að hafa komist í snertingu við prófunarefnið, má beita öðrum aðferðum (9. heimild).

1.2. SKILGREININGAR

Í öllum tilvikum skal nota staðlaðar, alþjóðlegar einingar (SI-einingar).

Prófunarefni: hvaða efni sem er, hvort sem það er móðurefnið eða ummyndunarefni sem máli skipta.

Ummyndunarefni: efni sem myndast við ummyndunarhvörf prófunarefnisins sem verða fyrir tilstilli lífvera eða án þeirra, þ.m.t. CO_2 og bundnar efnaleifar.

Bundnar efnaleifar: efnasambönd í jarðvegi, plöntum eða dýrum sem haldast í efniviðinum í formi móðurefnis eða umbrotsefna þess eftir útdrátt. Útdráttaraðferðin má ekki leiða til verulegra breytinga á sjálfum efnasamböndunum eða gerð efniviðarins. Að hluta til er unnt að skýra hvers eðlis tengin (bindingin) eru með útdráttaraðferðum, sem breyta efniviðinum, og háþróaðri greiningartækni. Fram að þessu hefur t.d. á þenna hátt verið hægt að greina samgild tengi, jónísk tengi og sogtengi, svo og innlyksur. Yfirleitt dregur myndun bundinna efnaleifa verulega úr aðgengi fyrir lífverur (10. heimild) [breytt frá IUPAC 1984 (11. heimild)].

Loftháð ummyndun: (oxun): efnahvörf sem verða í nálægð súrefnissameinda (12. heimild).

Loftfirrð ummyndun: (afoxun): efnahvörf sem verða án nálægðar súrefnissameinda (12. heimild).

Náttúrulegt vatn: yfirborðsvatn sem fæst úr tjörnum, ám, vatnsföllum o.s.frv.

Set: blanda jarðefna og lífrænna efnisþátta; hinir síðarnefndu eru kolefnis- og köfnunarefnisauðug efnasambönd með mikinn sameindamassa. Það fellur út úr náttúrulegu vatni og myndar skilflöt með því vatni.

Sundrun: fullkomið niðurbrot lífrænna efnasambanda yfir í CO_2 og H_2O við loftháðar aðstæður og í CH_4, CO_2 og H_2O við loftfirrðar aðstæður. Að því er varðar þessa prófunaraðferð merkir sundrun umfangsmikið niðurbrot sameinda sem verður þegar merkt kolefnisatóm eru oxuð eða afoxuð og tilsvarandi magn af $^{14}CO_2$ eða $^{14}CH_4$ losnar.

Helmingunartími: $t_{0,5}$, er sá tími sem 50% ummyndun prófunarefnis tekur þegar lýsa má ummynduninni með hraðafræði af fyrstu gráðu; hann er óháður upphafsstyrknum.

DT_{50} (sundrunartími 50): sá tími sem líður þar til upphafsstyrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 50%.

DT_{75} (sundrunartími 75): sá tími sem líður þar til upphafsstyrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 75%.

DT_{90} (sundrunartími 90): sá tími sem líður þar til upphafsstyrkur prófunarefnisins hefur minnkað um 90%.

1.3. VIÐMIÐUNAREFNI

Viðmiðunarefni skulu notuð til sanngreiningar og magngreiningar á ummyndunarefnunum með aðferðum þar sem litrófsgreinir og litskilja eru notuð.

1.4. UPPLÝSINGAR UM PRÓFUNAREFNIÐ

Nota má hvort sem er ómerkt eða samsætumerkt prófunarefni til að mæla ummyndunarhraðann, þótt fremur sé mælt með því að merkt efni séu notuð. Nota verður merkt efni við rannsóknir á ummyndunarferlunum og við ákvörðun massajöfnuðar. Mælt er með ^{14}C-merkingu en einnig getur verið gagnlegt að nota aðrar samsætur, t.d. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H og ^{32}P. Merkið skal, svo sem framast er kostur, vera í stöðugasta hluta eða hlutum sameindarinnar ([1]). Efnafræðilegur og/eða geislaefnafræðilegur hreinleiki prófunarefnisins skal vera a.m.k. 95%.

Áður en prófun er gerð skulu eftirfarandi upplýsingar um prófunarefnið liggja fyrir:

a) vatnsleysni (aðferð A.6),

b) leysni í lífrænum leysum,

c) gufuþrýstingur (aðferð A.4) og fasti samkvæmt lögmáli Henrys;

d) deilistuðull n-oktanóls/vatns (aðferð A.8),

e) ásogsstuðull (K_d, K_f eða K_{oc}, eftir því sem við á) (aðferð C.18),

f) vatnsrof (aðferð C.7),

g) klofnunarstuðull (pK_a) [OECD-leiðbeiningar 112] (13. heimild),

h) efnafræðileg bygging prófunarefnisins og staðsetning samsætumerkis eða -merkja, ef við á.

Athugasemd: skrá skal við hvaða hitastig þessar mælingar eru gerðar.

Aðrar gagnlegar upplýsingar geta t.d. verið gögn um eiturhrif prófunarefnisins á örverur, gögn um auðlífbrjótanleika og/eða eðlislægan lífbrjótanleika og gögn um loftháða og loftfirrða ummyndun í jarðvegi.

Greiningaraðferðir (þ.m.t. útdráttur og hreinsiaðferðir) fyrir magngreiningu og sanngreiningu prófunarefnisins og ummyndunarefna þess í vatni og seti skulu vera fyrir hendi (sjá lið 1.7.2).

([1]) Ef prófunarefnið inniheldur t.d. einn hring þarf að merkja þann hring; ef prófunarefnið inniheldur tvo eða fleiri hringi getur sérstök rannsókn verið nauðsynleg til að meta það hvað verður um hvern merktan hring og til að fá nægar upplýsingar um myndun ummyndunarefna.

1.5. MEGINREGLA PRÓFUNARAÐFERÐARINNAR

Í prófunaraðferðinni, sem hér er lýst, er notað vatnaset við loftháð og loftfirrð skilyrði (sjá 1. viðbæti), sem gerir mögulega:

mælingu á ummyndunarhraða prófunarefnisins í vatns- og setkerfi,

mælingu á ummyndunarhraða prófunarefnisins í setinu,

mælingu á sundrunarhraða prófunarefnisins og/eða ummyndunarefna þess (þar sem prófunarefni, merkt með ^{14}C, er notað),

sanngreiningu og magngreiningu ummyndunarefna í vatni og seti, þ.m.t. massajöfnuð (þegar merkt prófunarefni er notað),

mælingu á því hvernig prófunarefnið og ummyndunarefni þess skiptist milli fasanna tveggja á ræktunartímabili í myrkri (til að forðast t.d. þörungablóma) við stöðugt hitastig. Ákvarða skal helmingunartíma og gildi fyrir DT_{50}, DT_{75} og DT_{90} liggi næg gögn fyrir en ekki skal framreikna þau langt fram yfir tilraunatímabilið (sjá lið 1.2).

Nota þarf a.m.k. tvö set og tilheyrandi vatn, bæði við loftháð og loftfirrð prófunarskilyrði (7. heimild). Þó geta komið upp aðstæður þar sem nota þarf fleiri en tvö vatnaset, t.d. þegar um er að ræða íðefni sem kunna að vera til staðar í ferskvatni og/eða sjávarumhverfi.

1.6. NOTKUNARSVIÐ PRÓFUNARINNAR

Þessi prófun er almennt notuð fyrir efni (ómerkt eða geislamerkt) þar sem fyrir liggja nógu nákvæmar og næmar greiningaraðferðir. Hana er hægt að nota fyrir efnasambönd sem eru lítillega rokgjörn, órokgjörn, vatnsleysanleg eða torleysanleg í vatni. Prófunina skal ekki gera á íðefnum sem rjúka mjög upp úr vatni (t.d. svæliefnum og lífrænum leysum) og því erfitt að halda í vatni og/eða seti við tilraunaskilyrðin í þessari prófun.

Aðferðin hefur fram að þessu verið notuð til að rannsaka ummyndun íðefna í ferskvatni og seti en henni má að jafnaði beita á kerfi í árósum og sjó. Hún hentar ekki til að líkja eftir aðstæðum í straumvatni (t.d. ám) eða á rúmsjó.

1.7. GÆÐAVIÐMIÐANIR

1.7.1. **Endurheimt**

Útdráttur og greining á a.m.k. tveimur eins sýnum af vatni og seti strax eftir að prófunarefninu hefur verið bætt við gefur fyrstu vísbendingu um endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar og samræmi aðferðarinnar sem notuð er við ísetningu prófunarefnisins. Endurheimt fyrir síðari stig tilraunanna sjást af viðkomandi massajöfnuði (þegar merkt efni er notað). Endurheimt skal vera 90–110% fyrir merkt íðefni (6. heimild) og 70–110% fyrir ómerkt íðefni.

1.7.2. **Endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðar**

Unnt er að kanna endurtekningarnákvæmni greiningaraðferðarinnar við magngreiningu prófunarefnis og ummyndunarefna (að frátalinni upphaflegri skilvirkni í útdrætti), með tvöfaldri greiningu á sama útdrætti úr vatns- eða setsýnum, sem eru ræktuð svo lengi að ummyndunarefni myndist.

Greiningarmörk greiningaraðferðarinnar fyrir prófunarefnið og fyrir ummyndunarefnin skulu vera a.m.k. 0,01 $mg \cdot kg^{-1}$ í vatni eða seti (sem prófunarefni) eða 1% af upphaflegum skammti sem er settur í prófunarkerfið, hvort sem minna er af þessu tvennu. Magngreiningarmörkin skulu einnig tilgreind.

1.7.3. **Nákvæmni ummyndunargagna**

Aðhvarfsgreining á styrk prófunarefnisins, sem fall af tíma, gefur fullnægjandi upplýsingar um nákvæmni ummyndunarferilsins og gerir það kleift að reikna öryggismörkin fyrir helmingunartíma (þegar um er að ræða hraðafræði af sýndarfyrstu gráðu) eða DT_{50}-gildi og, ef við á, DT_{75}- og DT_{90}-gildi.

1.8. LÝSING Á AÐFERÐINNI

1.8.1. **Prófunarkerfi og búnaður**

Rannsóknina skal framkvæma í glerílátum (t.d. flöskum, skilvinduglösum) nema fyrirliggjandi upplýsingar (s.s. deilistuðull n-oktanóls og vatns, upplýsingar um sog o.s.frv.) bendi til að prófunarefnið geti loðað við gler og í slíkum tilvikum getur þurft að taka til athugunar staðgönguefni (s.s. teflon). Ef vitað er að prófunarefni loðir við gler er mögulegt að bæta úr vandamálinu með því að nota eina eða fleiri af eftirfarandi aðferðum:

— ákvarða massa prófunarefnis og ummyndunarefna sem ásogast á gler,

— tryggja að öll glerílát séu skoluð með leysi í lok prófunarinnar,

— nota samsettar vörur (sjá einnig lið 1.9.2),

— nota meira magn af meðleysi við ísetningu prófunarefnisins í kerfið en ef meðleysir er notaður má hann ekki vera þeirrar gerðar að hann hvarfist við prófunarefnið.

Dæmi um venjulegan prófunarbúnað, þ.e. gasgegnumstreymiskerfi og lífmælingakerfi eru sýnd á 2. og 3. mynd (14. heimild). Öðrum gagnlegum ræktunarkerfum er lýst í 15. heimild. Tilraunabúnaðurinn skal vera þannig gerður að loft- og köfnunarefnisskipti geti orðið og að fanga megi rokgjörn efni í gildru. Stærðarmál búnaðarins skulu vera þannig að kröfur um prófunina séu uppfylltar (sjá lið 1.9.1). Loftun skal annaðhvort vera með vægri loftbólun eða með því að láta loft eða köfnunarefni streyma yfir vatnsyfirborðið. Í síðara tilvikinu getur verið ráðlegt að hræra varlega í vatninu ofan frá svo að súrefnið og köfnunarefnið blandist vatninu betur. Ekki skal nota loft án CO_2 þar eð það getur valdið því að sýrustig vatnsins hækki. Í báðum tilvikum er óæskilegt að hreyfa sé við setinu og skal forðast það eftir föngum. Prófa skal íðefni, sem eru lítillega rokgjörn, í lífmælingakerfi þar sem hrært er varlega í vatnsyfirborðinu. Einnig má nota lokuð ílát með kollrúmi sem er fyllt andrúmslofti eða köfnunarefni og þar sem eru innbyggð ílát til að fanga rokgjörn efni (16. heimild). Nauðsynlegt er að skipta reglulega um loft í kollrúminu í loftháðri prófun til að bæta upp súrefnisupptöku lífmassans.

Hentugar gildrur til að safna rokgjörnum ummyndunarefnum geta t.d. innihaldið 1 mól dm^{-3} kalíumhýdroxíð- eða natríumhýdroxíðlausnir fyrir koltvísýring ([1]) og etýlenglýkól, etanólamín eða 2% paraffín í xýleni fyrir lífræn efnasambönd, en fleiri kostir standa til boða. Rokgjörnum efnum, t.d. metani, sem myndast við loftfirrðar aðstæður, má safna með sameindasíum. Brenna má rokgjörn efni af þessu tagi, svo að myndist CO_2, t.d. með því að láta gasið fara gegnum kvarsrör fyllt með CuO við hitastigið 900 °C og fanga það CO_2, sem myndast, í gleypi með basa (17. heimild).

Nauðsynlegt er að hafa tækjabúnað rannsóknarstofu fyrir efnagreiningu á prófunarefni og ummyndunarefnum (t.d. fyrir gas-vökvagreiningu (GLC), háþrýstivökvaskiljun (HPLC), þunnlagsskiljun (TLC), massagreiningu (MS), gas- og massagreiningu (GC-MS), vökvaskiljun og massagreiningu (LC-MS), segulómun (NMR) o.s.frv.), þ.m.t. greinikerfi fyrir geislamerkt eða ómerkt íðefni, eftir því sem við á. Ef geislamerkt efni er notað er einnig þörf á vökvasindurteljara og brennsluofni (til brennslu sýna úr seti áður en kemur að greiningu á geislavirkni).

Einnig þarf að vera fyrir hendi annar staðlaður rannsóknarstofubúnaður fyrir eðlisefnafræðilegar og líffræðilegar ákvarðanir (sjá töflu 1, lið 1.8.2.2), glervara, íðefni og prófefni eftir þörfum.

1.8.2. **Val og fjöldi sýna úr vatnaseti**

Ávallt skal velja sýnatökustaði í samræmi við tilganginn með prófuninni. Við val á sýnatökustað þarf að taka tillit til fyrri sögu um hugsanlega losun frá landbúnaði, iðnaði eða heimilishaldi á aðrennslissvæðinu og einnig skal kanna vatnið ofan viðkomandi svæðis. Ekki skal nota set hafi það mengast af prófunarefninu eða efnum með hliðstæða byggingu síðustu fjögur árin.

([1]) Þar eð þessar basísku ísogslausnir gleypa einnig koltvísýring úr loftræstilofti og þann koltvísýring, sem myndast við öndun í loftháðum tilraunum, þarf að skipta reglulega um þær til að komast hjá því að þær mettist og missi þar með ísogshæfni sína.

1.8.2.1. *Val á seti*

Í rannsóknum við loftháð skilyrði eru vanalega notaðar tvær gerðir af seti (7. heimild). Setin tvö sem eru valin skulu vera ólík að því er varðar innihald af lífrænu kolefni og kornastærð. Annað setið skal hafa hátt hlutfall lífræns kolefnis (2,5–7,5%) og vera fínkornótt en hitt setið skal hafa lágt hlutfall lífræns kolefnis (0,5–2,5%) og vera grófkornótt. Munurinn á innihaldi af lífrænu kolefni skal að jafnaði vera a.m.k. 2%. „Fínkornótt set“ er skilgreint sem set þar sem [leir + silt]-innihaldið ([1]) er > 50% og „grófkornótt set“ er skilgreint sem set þar sem [leir + silt]-innihaldið er < 50%. Munurinn á innihaldi [leirs + silts] í þessum tveimur setum skal að jafnaði vera a.m.k. 20%. Í tilvikum þar sem íðefni geta einnig borist í sjó skal a.m.k. eitt af vatns- og setkerfunum vera úr sjó.

Í rannsókn sem fer að öllu leyti fram við loftfirrð skilyrði skal tekið sýni úr tvenns konar seti (ásamt tilheyrandi vatni) úr loftfirrðum stöðum í yfirborðsvatnshloti (7. heimild). Bæði set- og vatnsfasinn skulu meðhöndlaðir og fluttir varlega án þess að súrefni komi þar nærri.

Aðrir mæliþættir kunna að vera mikilvægir við val á seti og skal vega þá og meta í hverju tilviki um sig. Til dæmis væri sýrustigsbil setsins mikilvægt fyrir prófun á íðefnum þar sem ummyndun og/eða ásog geta verið háð sýrustigi. Ef sog er háð sýrustigi getur það komið fram í pKa-gildi prófunarefnisins.

1.8.2.2. *Lýsing á sýnum vatns og sets*

Í töflunni hér á eftir eru tilgreindir lykilmæliþættir, bæði fyrir vatn og set, sem nauðsynlegt er að meta og gera grein fyrir (með tilvísun í aðferðina sem er notuð) og einnig á hvaða stigi prófunarinnar þessir mæliþættir skuli ákvarðaðir. Aðferðunum, sem eru notaðar til að ákvarða þessa mæliþætti, er lýst í 18.–21. heimild.

Enn fremur getur verið nauðsynlegt að meta aðra mæliþætti og gera grein fyrir þeim í hverju tilviki um sig (t.d. fyrir ferskvatn: agnir, basastig, hörku, eðlisleiðni, NO_3/PO_4 (hlutfall og gildi hvors um sig); fyrir set: plúsjónaskiptagetu, vatnsheldni, karbónat, heildarköfnunarefni og -fosfór, og fyrir kerfi í sjó: seltu). Einnig getur verið gagnlegt að greina set og vatn með tilliti til nítrats, súlfats, lífaðgengilegs járns og hugsanlega annarra rafeindaþega þegar metin eru skilyrði til afoxunar/oxunar, einkum í tengslum við loftfirrða ummyndun.

Mæling á mæliþáttum fyrir lýsingu á sýnum vatns og sets (7., 22. og 23. heimild)

Mæliþáttur	Stig prófunaraðferðar					
	sýnataka	Eftirmeð-höndlun	upphaf aðlögunar	upphaf prófunar	í prófun	lok prófunar
Vatn						
Uppruni/upptök	x					
Hitastig	x					
Sýrustig	x		x	x	x	x
Heildarmagn lífræns kolefnis			x	x		x
Styrkur O2 *	x		x	x	x	x
Oxunar-/afoxunarmáttur*			x	x	x	x

([1]) [Leir + silt] er sá jarðefnahluti setsins þar sem kornastærð er < 50 µm.

Mæliþáttur	Stig prófunaraðferðar					
	sýnataka	Eftirmeð-höndlun	upphaf aðlögunar	upphaf prófunar	í prófun	lok prófunar
Set						
Uppruni/upptök	x					
Dýpt setlags	x					
Sýrustig		x	x	x	x	x
Dreifing kornastærðar		x				
Heildarmagn lífræns kolefnis		x	x	x		x
Lífmassi örvera *		x		x		x
Oxunar-/afoxunarmáttur**	Athugun (litur/lykt)		x	x	x	x

(*) Aðferð byggð á öndun lífvera (26. heimild), svælingaraðferð (27. heimild) eða mæling á líftölu (t.d. bakteríur, geislasveppir, sveppir og þyrpingar sem heild) fyrir loftháðar rannsóknir; myndunarhraði metans fyrir rannsóknir við loftfirrð skilyrði.

(**) Nýlegar rannsóknarniðurstöður hafa sýnt að mælingar á styrk súrefnis í vatni og á oxunar-/afoxunarmætti segja lítið til um verkunarmáta og hafa lítið forspárgildi að því er varðar vöxt og þróun örverusamfélaga í yfirborðsvatni (24. og 25. heimild). Ákvörðun á lífrænni súrefnisþörf (BOD, við sýnatöku, upphaf og lok prófunar) og á styrk snefilefna og helstu næringarefna, Ca, Mg og Mn, (við upphaf og lok prófunar) í vatni og við mælingu á heildarmagni N og heildarmagni P í seti (við sýnatöku og lok prófunar) getur verið betra tæki til að túlka og meta loftháðan, lífummyndunarhraða og lífummyndunarferlin.

1.8.3. **Taka sýna, meðhöndlun þeirra og geymsla**

1.8.3.1. *Sýnataka*

Við töku sýna úr seti skal styðjast við drögin að leiðbeiningum ISO um töku sýna úr botnseti (8. heimild). Taka skal setsýni úr öllu efsta lagi setsins (efstu 5 til 10 cm). Tilheyrandi vatn skal tekið á sama stað og sama tíma og setsýnið. Í rannsókn við loftfirrð skilyrði skal taka setsýni og tilheyrandi vatn án þess að súrefni komi þar nærri og súrefni má heldur ekki komast að þeim við flutning (28. heimild) (sjá lið 1.8.2.1). Nokkrum tegundum sýnatökubúnaðar er lýst í 8. og 23. heimild.

1.8.3.2. *Meðhöndlun*

Setið er aðskilið frá vatninu með síun og setið votsigtað gegnum 2 mm sigti og notað til þess umframvatn af sama stað, sem síðan er fleygt. Þá er þekktu magni af seti og vatni blandað saman í æskilegum hlutföllum (sjá lið 1.9.1), það sett í ræktunarflöskur og búið undir aðlögunartímann (sjá lið 1.8.4). Í rannsókn við loftfirrð skilyrði skulu öll stig meðhöndlunarinnar fara fram án þess að súrefni komi þar nærri (29.–33. heimild).

1.8.3.3. *Geymsla*

Eindregið er mælt með því að nota nýtekin sýni og vatn en ef nauðsynlegt er að geyma setið og vatnið skal sigta þau eins og lýst er hér að framan og geyma saman, vatnsmettuð (undir 6–10 cm vatnslagi), í myrkri við 4 ± 2 °C[1] í 4 vikur að hámarki (7., 8. og 23. heimild). Sýni, sem nota á í rannsóknum við loftháð skilyrði, skulu geymd þar sem loft leikur um þau (t.d. í opnum ílátum) en sýni, sem eru ætluð til rannsókna við loftfirrð skilyrði, skulu geymd þar sem súrefni kemur hvergi nærri. Setið og vatnið mega ekki frjósa og setið má heldur ekki þorna meðan á flutningi og geymslu stendur.

1.8.4. **Tilreiðsla sets- og vatnssýna fyrir prófun**

Hafa skal aðlögunartímabil áður en prófunarefninu er bætt við, þar sem hvert sets- og vatnssýni er sett í ræktunarílátið sem nota á í meginprófuninni og aðlögunin fer fram við nákvæmlega sömu skilyrði og ríkja við ræktunina í prófuninni (sjá lið 1.9.1). Aðlögunartímabilið stendur yfir í þann tíma sem þarf til að ná nægilegum stöðugleika í kerfinu að því er varðar sýrustig, súrefnisstyrk í vatni, oxunar-/afoxunarmátt

setsins og vatnsins og stórsæjan aðskilnað á fösum. Aðlögunartímabilið skal að jafnaði standa yfir í eina til tvær vikur og skal ekki vera lengra en fjórar vikur. Skrá skal allar niðurstöður úr ákvörðunum sem eru gerðar á þessu tímabili.

1.9. FRAMKVÆMD PRÓFUNARINNAR

1.9.1. **Prófunarskilyrði**

Prófunin skal fara fram í ræktunarbúnaðinum (sjá lið 1.8.1) þar sem hlutfall vatns og sets er á bilinu 3:1 og 4:1 og setlagið er 2,5 (± 0,5 cm). ([1]) Mælt er með 50 g af seti að lágmarki (þurrvigt) í hverju ræktunaríláti.

Prófunin skal fara fram í myrkri við stöðugt hitastig á bilinu 10 til 30 °C. Hitastigið 20 ± 2 °C er hæfilegt. Ef við á má í einstökum tilvikum bæta við prófun við lægri hita (t.d. 10 °C), eftir því hvaða upplýsingar þarf að fá út úr prófuninni. Vakta skal hitastigið í ræktuninni og skrá það.

1.9.2. **Meðhöndlun og ísetning prófunarefnis**

Notaður er einn prófunarstyrkur af íðefninu ([2]). Þegar plöntuvarnarefni eru sett beint í vatnshlot er notaður sá hámarksskammtur sem er tilgreindur á merkimiðanum, reiknaður út frá yfirborðsfleti þess vatns sem er í prófunarílátinu. Í öllum öðrum tilvikum skal sá styrkur sem er notaður byggjast á spám varðandi losun út í umhverfið. Gæta þarf þess að tryggja að styrkur prófunarefnisins sem er notaður nægi til að unnt verði að lýsa ummyndunarleiðinni og myndun og minnkun ummyndunarefnanna. Nauðsynlegt getur verið að nota stærri skammta (t.d. tífalda) við aðstæður þar sem styrkur prófunarefnisins er nærri greiningarmörkum við upphaf rannsóknarinnar og/eða í tilvikum þar sem ekki er auðveldlega hægt að greina helstu ummyndunarefni ef styrkur þeirra er 10% af skammti prófunarefnisins. Ef hærri prófunarstyrkir er notaðir skulu þeir þó ekki hafa veruleg, skaðleg áhrif á starfsemi örvera í vatns- og setkerfinu. Til að ná stöðugum styrk prófunarefnisins í ílátum af mismunandi stærð getur aðlögun að magni ísetningarefnisins talist viðeigandi og þá á grundvelli dýptar vatnssúlunnar í ílátinu miðað við dýpt vatnsins í náttúrunni (sem telst vera 100 cm, en önnur dýpt getur einnig komið til greina). Sjá dæmi um útreikning í 4. viðbæti.

Best er að prófunarefnið sé í vatnslausn þegar það er sett í vatnsfasa prófunarkerfisins. Ef ekki verður hjá því komist má nota litla skammta af vatnsleysanlegum leysum (s.s. aseton, etanól) við ísetningu og dreifingu prófunarefnisins en þeir ættu ekki að fara yfir 1% (miðað við rúmmál) og mega ekki hafa skaðleg áhrif á virkni örvera í prófunarkerfinu. Gæta skal varúðar þegar vatnslausn er búin til með prófunarefninu – heppilegt getur verið að nota sytursúlur og forblöndun til að tryggja fullkomna einsleitni. Þegar vatnslausninni hefur verið bætt í prófunarkerfið er mælt með að vatnsfasanum sé blandað varlega við svo að eins lítil röskun verði á setinu sem framast er kostur.

Ekki er að jafnaði mælt með því að samsettar vörur séu notaðar þar eð innihaldsefni í samsetningunni geta haft áhrif á dreifingu prófunarefnisins og/eða ummyndunarefnanna milli vatns- og setfasanna. Ef prófunarefnið er torleysanlegt í vatni getur þó verið heppilegt að nota samsett efni í staðinn.

Fjöldi ræktunaríláta fer eftir því hve oft sýni eru tekin (sjá lið 1.9.3). Svo mörg prófunarkerfi skulu vera í prófuninni að taka megi tvö kerfi úr notkun við hverja sýnatöku. Ef samanburðareiningar eru notaðar fyrir hvert vatnasetkerfi skulu þær ekki meðhöndlaðar með prófunarefninu. Nota má samanburðareiningarnar til að ákvarða lífmassa örveranna í setinu og heildarmagn lífræns kolefnis í vatninu og setinu við lok rannsóknarinnar. Nota má tvær samanburðareiningar (þ.e. eina samanburðareiningu fyrir hvort vatnaset) til að fylgjast með tilskildum mæliþáttum í seti og vatni á aðlögunartímabilinu (sjá töflu í lið 1.8.2.2). Bæta

([1]) Nýlegar rannsóknir hafa sýnt að geymsla við 4 °C getur valdið því að innihald lífræns kolefnis í seti minnkar og það getur hugsanlega leitt til minnkunar á starfsemi örvera (34. heimild).

([2]) Prófun með öðrum styrkleika til viðbótar getur verið gagnleg þegar um er að ræða íðefni sem berast í yfirborðsvatn eftir ýmsum leiðum (sem veldur þá talsverðum breytileika í styrk), að því tilskildu að unnt sé að greina minni styrkinn með nægri nákvæmni.

verður við tveimur samanburðareiningum til viðbótar ef prófunarefnið er sett í með leysi til að mæla skaðleg áhrif á virkni örvera í prófunarkerfinu.

1.9.3. **Lengd prófunar og sýnataka**

Tilraunin skal að jafnaði ekki standa lengur en í 100 daga (6. heimild) og skal halda henni áfram þar til niðurbrotsferli og dreifingarmynstur í vatni og seti hafa verið ákvörðuð eða þar til 90% af prófunarefninu hefur eyðst með ummyndun og/eða uppgufun. Sýni skulu tekin í a.m.k. sex skipti (þ.m.t. á tímapunkti núll) með eða án undanfarandi rannsóknar, sem er valfrjáls (sjá lið 1.9.4) en er þá gerð til að ákveða heppilega sýnatökuáætlun og lengd prófunarinnar, nema nægileg gögn liggi fyrir um prófunarefnið úr fyrri rannsóknum. Þegar um er að ræða vatnsfælin prófunarefni getur verið nauðsynlegt að fjölga sýnatökutilvikum til að geta ákvarðað dreifingarhlutfallið milli vatns- og setfasa.

Á viðeigandi sýnatökutímum eru ræktunarílát í heild sinni (með sýnum til samhliða prófana) fjarlægð til greiningar. Set og yfirliggjandi vatn eru greind hvort í sínu lagi ([1]). Fjarlægja skal yfirborðsvatnið varlega þannig að setið raskist sem minnst. Fylgja skal viðeigandi greiningarferli við útdrátt og lýsingu á prófunarefninu og ummyndunarefnunum. Gæta skal þess að fjarlægja efni, sem gætu hafa ásogast við ræktunarílátið eða tengileiðslurnar sem eru notaðar til að fanga rokgjörn efni.

1.9.4. **Valfrjáls forprófun**

Ef ekki er unnt að ákvarða lengd prófunarinnar og sýnatökuáætlunina út frá öðrum viðeigandi rannsóknum á prófunarefninu getur talist viðeigandi að gera valfrjálsa forprófun sem skal gerð við sömu prófunarskilyrði og þau sem nota á í endanlegri rannsókn. Ef forprófun er gerð skal gera stuttlega grein fyrir þeim tilraunaskilyrðum sem skipta máli og helstu niðurstöðum.

1.9.5. **Mælingar og greining**

Mæla skal styrk prófunarefnisins og ummyndunarefna í hvert sinn sem sýni eru tekin úr vatni og seti og skrá hann (sem styrk og sem hundraðshluta af ísettu magni). Almenna reglan er sú að greina skuli þau ummyndunarefni sem reynast hafa $\geq$ 10% af þeirri geislavirkni sem er sett í heildarkerfi vatns og sets við hverja sýnatöku nema gild rök séu færð fyrir því að gera það ekki. Einnig skal vega og meta hvort sanngreina skuli ummyndunarefni ef styrkur þeirra vex stöðugt meðan prófunin stendur, jafnvel þótt styrkur þeirra fari ekki yfir fyrrgreind mörk, þar eð það getur verið vísbending um þrávirkni þeirra. Þetta skal vegið og metið í hverju tilviki fyrir sig og rökstutt í skýrslunni.

Skrá skal við hverja sýnatöku niðurstöður fyrir kerfi sem fanga lofttegundir/rokgjörn efni (CO_2 og fleiri, þ.e. rokgjörn, lífræn efnasambönd). Skrá skal sundrunarhraðann. Skrá skal óútdraganlegar (bundnar) efnaleifar í seti í hvert sinn sem sýni eru tekin.

2. **GÖGN**

2.1. ÚRVINNSLA NIÐURSTAÐNA

Reikna skal út heildarmassajöfnuð eða endurheimt (sjá lið 1.7.1) fyrir viðbætta geislavirkni í hvert sinn sem sýni eru tekin. Niðurstöður skulu skráðar sem hundraðshlutar af viðbættri geislavirkni. Skrá skal dreifingu geislavirkni í vatni og seti sem styrk og hundraðshluta í hvert sinn sem sýni eru tekin.

Reikna skal úr helmingunartíma prófunarefnisins, DT_{50} og, ef við á, DT_{75} og DT_{90} ásamt öryggismörkum (sjá lið 1.7.3). Upplýsinga um það hversu hratt prófunarefnið eyðist úr vatni og seti má afla með viðeigandi matsaðferðum. Þær geta verið fólgnar í beitingu hraðafræði af sýndarfyrstu gráðu, ferilnálgunum, sem eru byggðar á reynslu þar sem myndrænum eða tölulegum lausnum er beitt, og flóknara mati þar sem ferillinn er t.d. nálgaður í einu lagi eða í bútum (eins hólfs eða margra hólfa líkön). Frekari upplýsingar má finna í 35.–37. heimild.

Allar aðferðir hafa sína kosti og galla og eru mjög misflóknar. Sé gengið út frá hraðafræði af fyrstu gráðu getur það verið of mikil einföldun á niðurbrots- og dreifingarferlunum en þegar það er raunhæft fást hugtök (hraðafasti eða helmingunartími) sem eru auðskilin og nýtast við gerð hermilíkana og útreikning á áætluðum styrk í umhverfinu. Aðferðir byggðar á athugunum eða línuleg ummyndun geta gefið betri

([1]) Í tilvikum þar sem ummyndurarefni, sem myndast við loftfirrð skilyrði, geta enduroxast hratt skal loftfirrðum skilyrðum viðhaldið meðan á sýnatöku og greiningu stendur.

aðlögun ferla að gögnum og þannig gert auðveldara að áætla helmingunartíma, DT_{50}-gildi og ef við á, DT_{75}- og DT_{90}-gildi. Afleiddir fastar hafa þó takmarkað notagildi. Með hólfalíkönum geta fengist margir gagnlegir fastar sem hafa þýðingu við áhættumat og lýsa niðurbrotshraða í mismunandi hólfum og dreifingu íðefnisins. Einnig ætti að nota þau til að áætla hraðafasta í tengslum við myndun og niðurbrot helstu ummyndunarefna. Í hverju tilviki þarf að færa rök fyrir vali á viðkomandi aðferð og rannsakandinn skal sýna fram á mátgæði hennar, myndrænt og/eða tölfræðilega.

3. **SKÝRSLUGJÖF**

3.1. PRÓFUNARSKÝRSLA

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

Prófunarefni:

— almennt heiti, efnaheiti, CAS-númer, byggingarformúla (þ.m.t. staðsetning merkis eða merkja ef geislamerkt efni eru notuð) og þeir eðlisefnafræðilegu eiginleikar sem skipta máli,

— hreinleiki (óhreinindi) prófunarefnis,

— geislaefnafræðilegur hreinleiki merktra íðefna og mólvirkni (eftir því sem við á).

Viðmiðunarefni:

— efnaheiti og bygging viðmiðunarefnisins sem er notað til lýsingar og/eða sanngreiningar á ummyndunarefnum.

Prófunarset og -vatn:

— staðsetning og lýsing á stað eða stöðum þar sem sýni eru tekin úr vatnaseti, þ.m.t. saga mengunar ef unnt er,

— allar upplýsingar um töku, geymslu (ef um hana er að ræða) og aðlögun vatns- og setkerfa,

— eiginleikar vatns- og setsýna eins og tilgreint er í töflunni í lið 1.8.2.2.

Prófunarskilyrði:

— prófunarkerfið sem er notað (t.d. gegnumstreymi, lífmælingar, loftunaraðferð, aðferð við blöndun, vatnsmagn, massi sets, þykkt bæði vatns- og setlags, stærðarmál prófunaríláta o.s.frv.),

— ísetning prófunarefnis í prófunarkerfið: prófunarstyrkur sem er notaður, fjöldi samhliða sýna og samanburðarsýna, aðferð við ísetningu prófunarefnis (t.d. notkun leysis ef um hann er að ræða) o.s.frv.,

— ræktunarhiti,

— sýnatökutímar,

— útdráttaraðferðir og skilvirkni, svo og greiningaraðferðir og greiningarmörk,

— aðferðir við lýsingu/sanngreiningu á ummyndunarefnum,

— frávik frá aðferðarlýsingu prófunar eða prófunarskilyrðum í rannsókninni.

Niðurstöður:

— óunnin gögn (töluleg gildi) um dæmigerðar greiningar (öll óunnin gögn skulu skjöluð samkvæmt reglum um góðar starfsvenjur við rannsóknir),

— endurtekningarnákvæmni og næmi greiningaraðferðanna sem eru notaðar,

— endurheimtarhlutföll (gildi í % fyrir gilda rannsókn eru gefin upp í lið 1.7.1),

— töflur með niðurstöðum, sem gefnar eru upp sem hundraðshlutar af notuðum skammti og sem $mg \cdot kg^{-1}$ í vatni, seti og heildarkerfi (aðeins í %) fyrir prófunarefnið og ef við á, fyrir ummyndunarefni og óútdraganlega geislavirkni,

— massajöfnuður í rannsóknunum og við lok þeirra,

— myndræn framsetning á ummyndun í vatni, seti og í heildarkerfinu (þ.m.t. sundrun),

— sundrunarhraði,

— helmingunartími prófunarefnisins, DT_{50}-gildi, og, ef við á, DT_{75}- og DT_{90}-gildi og, eftir því sem við á, helstu ummyndunarefna, þ.m.t. öryggismörk í vatni, seti og í heildarkerfinu,

— mat á ummyndunarhraða prófunarefnisins og, ef við á, helstu ummyndunarefna,

— líkleg ummyndunarferli, eftir því sem við á,

— umræða um niðurstöður.

4. **HEIMILDIR**

1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process., (1990) Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide., (1991) Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

3) MAFF Pesticides Safety Directorate., (1992) Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate., (1987) Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. bls. 35-37.

5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982) Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

6) SETAC-Europe publication., (1995) Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

7) OECD Test Guidelines Programme., (1995) Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18- 20 January 1995.

8) ISO/DIS 5667-12., (1994) Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

9) US-EPA (1998a) Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, bls. 149-158.

15) Guth, J.A., (1981) Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997) Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, bls. 631-637.

17) Steber, J., Wierich, P. (1987) The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, bls. 661-667.

18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No 9. American Society of Agronomy, Madison.

19) APHA (1989) Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

20) Rowell, D.L. (1994) Soil Science Methods and Applications. Longman.

21) Light, T.S., (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, bls. 1038-1039.

22) SETAC-Europe publication (1991) Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop "A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests", 3- 4 July 1991.

23) SETAC-Europe publication. (1993) Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop on Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8- 10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997) Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, bls. 2858-2868.

25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999) Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, bls. 329-338.

26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985) Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. Soil Biol. Biochem. 17, bls. 197-203.

27) ISO-14240-2., (1997) Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen., (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), bls. 13-21.

29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, bls. 850-857.

30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, bls. 1527-1550.

31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993) Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, bls. 1499-1509.

32) Nuck, B.A. and Federle, T.W., (1986) A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, bls. 3597-3603.

33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

34) Sijm, Haller and Schrap (1997) Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, bls. 961-968.

35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, bls. 187-203.

36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, bls. 47-60.

37) Carlton, R.R., and Allen, R., (1994) The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, bls. 1349-1354.

1. viðbætir

LEIÐBEININGAR UM LOFTHÁÐ OG LOFTFIRRÐ PRÓFUNARKERFI

Loftháð prófunarkerfi

Loftháða prófunarkerfið, sem lýst er í þessari prófunaraðferð, er gert úr vatnslagi við loftháð skilyrði (dæmigerður súrefnisstyrkur er 7–10 mg · l^{-1}) og setlagi þar sem skilyrði eru loftháð við yfirborðið en loftfirrð undir yfirborðinu (dæmigerður oxunar-/afoxunarmáttur (E_h) í loftháða hluta setsins er til jafnaðar – 80 til – 190 mV). Rakabætt loft er látið leika um yfirborð vatnsins í hverri ræktunareiningu til að halda nægu súrefni í kollrúminu.

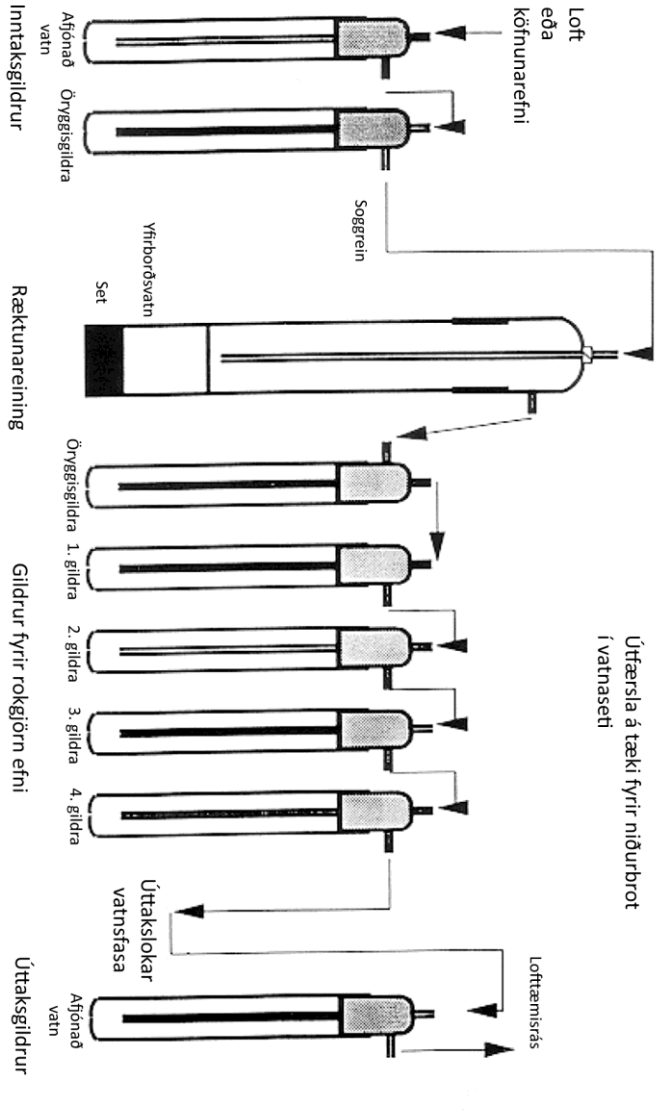
Loftfirrð prófunarkerfi

Í loftfirrðu prófunarkerfi er prófunaraðferðin í meginatriðum sú sama og í loftháðu kerfi með þeirri undantekningu að rakabætt köfnunarefni er látið leika um yfirborð vatnsins í hverri ræktunareiningu til að halda kollrúminu köfnunarefnisfylltu. Setið og vatnið teljast vera við loftfirrð skilyrði ef oxunar-/afoxunarmátturinn (Eh) er lægri en – 100 mV.

Í loftfirrðri prófun felur mat á sundrun í sér mælingu á þeim koltvísýringi og því metani sem myndast.

2. viðbætir

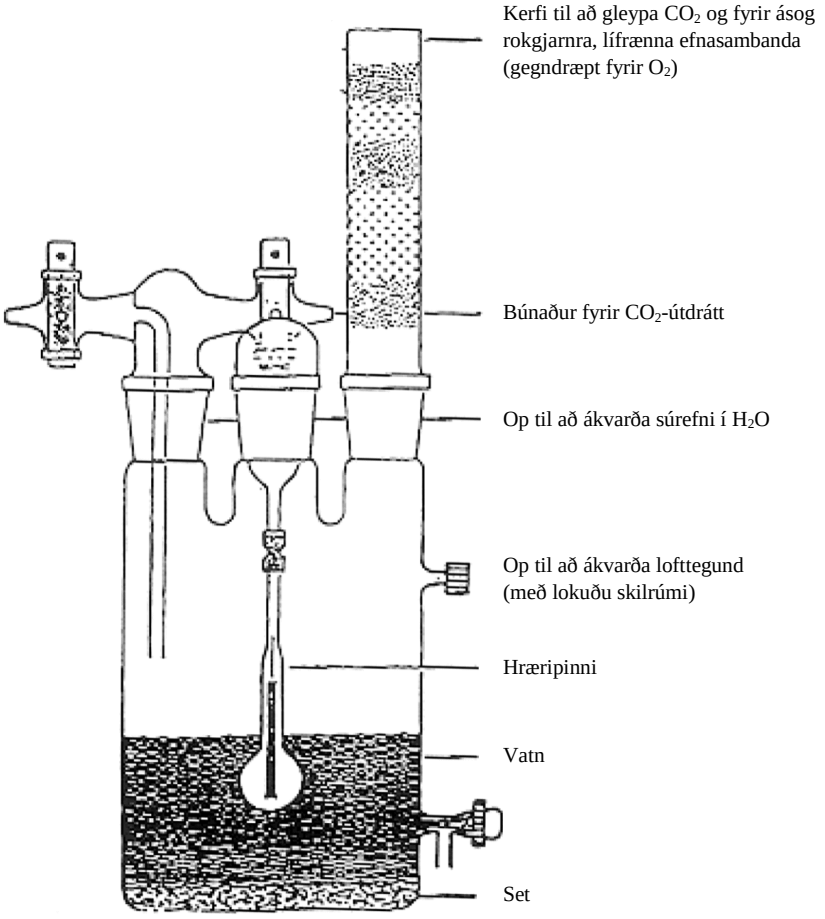
DÆMI UM GASGEGNUMSTREYMISTÆKI



Öryggisgildra, tóm
1. gildra:
etýlenglýkól til að fanga rokgjörn, lífræn efni
2. gildra:
0,1 M brennisteinssýra til að fanga basísk, rokgjörn efni

3. viðbætir

DÆMI UM LÍFMÆLINGABÚNAÐ (BIOMETER APPARATUS)



Segulhræribúnaður

4. viðbætir

DÆMI UM ÚTREIKNING Á SKAMMTI SEM ER SETTUR Í PRÓFUNARÍLÁT

Innanmál mæliglass:	= 8 cm
Dýpt vatnssúlu, án sets:	= 12 cm
Yfirborðsflatarmál: $3{,}142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Umfang notkunar: 500 g prófunarefnis á hektara samsvarar 5 µg/cm^2	
Alls í µg: $5 \times 50{,}3$	= 251,5 µg
Magnið leiðrétt svo að það samsvari 100 cm dýpt:	
$12 \times 251{,}5 \div 100$	= 30,18 µg
Rúmmál vatnssúlu: $50{,}3 \times 12$	= 603 ml
Styrkur í vatni: $30{,}18 \div 603$	= 0,050 µg/ml eða 50 µg/l