

TILSKIPUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR 98/73/EB

2006/EES/58/30

frá 18. september 1998

um tuttugustu og fjórðu aðlögun að tækniframförum á tilskipun ráðsins 67/548/EBE um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna (*)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

SAMÞYKKT TILSKIPUN ÞESSA:

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

1. gr.

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 67/548/EBE frá 27. júní 1967 um samræmingu ákvæða í lögum og stjórnsýslufyrirmælum um flokkun, pökkun og merkingu hættulegra efna ⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með tilskipun framkvæmdastjórnarinnar 97/69/EB ⁽²⁾, einkum 28. gr.,

Tilskipun 67/548/EBE er hér með breytt sem hér segir:

1. Ákvæðum I. viðauka er breytt sem hér segir:

a) færslurnar í I. viðauka við þessa tilskipun koma í stað samsvarandi færslna í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE;

b) færslurnar í II. viðauka við þessa tilskipun eru felldar inn í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE.

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

Í I. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er skrá yfir hættuleg efni ásamt upplýsingum um flokkun og merkingu hvers efnis. Í ljósi nýjustu vísinda- og tæknipækkingar skal aðlaga og bæta við skrána um hættuleg efni í viðaukanum.

2. Ákvæðum V. viðauka er breytt sem hér segir:

a) textinn í III. viðauka A, III. viðauka B og III. viðauka C við þessa tilskipun bætist við A-hluta í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE;

b) textinn í III. viðauka D við þessa tilskipun bætist við C-hluta í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE.

Í V. viðauka við tilskipun 67/548/EBE er mælt fyrir um aðferðir til að ákvarða eðlisefnafræðilega eiginleika, eiturhrif og visteiturhrif efna og efnablandna. Nauðsynlegt er að aðlaga viðaukann að tækniframförum.

2. gr.

Ákvæði þessarar tilskipunar eru í samræmi við álit nefndar um aðlögun að tækniframförum á tilskipunum um að ryðja úr vegi tæknilegum hindrunum í viðskiptum með hættuleg efni og efnablöndur.

Aðildarríkin skulu samþykkja nauðsynleg lög og stjórnsýslufyrirmæli til að fara að tilskipun þessari eigi síðar en 31. október 1999. Þau skulu tilkynna það framkvæmdastjórninni þegar í stað.

Þegar aðildarríkin samþykkja þessar ráðstafanir skal vera í þeim tilvísun í þessa tilskipun eða þeim fylgja slík tilvísun

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. EB L 305, 16.11.1998, bls. 1. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 59/2004 frá 26. apríl 2004 um breytingu á II. viðauka (Tæknilegar reglugerðir, staðlar, prófanir og vottun) við EES-samninginn, sjá *EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins* nr. 43, 26.8.2004, bls. 25.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 196, 16. 8. 1967, bls. 1.

⁽²⁾ Stjtið. EB L 343, 13. 12. 1997, bls. 19.

Þegar þær eru birtar opinberlega. Aðildarríkin skulu setja nánari reglur um slíka tilvísun.

3. gr.

Tilskipun þessi öðlast gildi á tuttugasta degi eftir að hún birtist í *Stjórnartíðindum Evrópubandalaganna*.

4. gr.

Tilskipun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 18. september 1998.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

Ritt BJERREGAARD

framkvæmdastjóri.

Hægt er að nálgast viðauka I og II (bls. 269 - 408) í Stjórnartíðindum Evrópusambandsins með því að smella hér.

III. VIÐAUKA

A.18. MEÐALMÓLMASSI MIÐAÐ VIÐ FJÖLDA OG MÓLMASSADREIFING FJÖLLIÐNA

1. **ADFERÐ**

Þessi gegndræpisskiljun er sama aðferð og OECD TG 118 (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 (GPC) þegar um flóknar fjölliður er að ræða. Ef gegndræpisskiljun verður ekki við komið má ákvarða mólmassa með öðrum aðferðum (sjá viðauka). Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem notuð er og rökstyðja notkun hennar.

Aðferðin, sem lýst er, byggist á DIN-staðli 55672 (1. heimild). Nákvæmar upplýsingar um framkvæmd tilrauna og hvernig meta á gögnin er að finna í þessum DIN-staðli. Ef nauðsynlegt er að breyta skilyrðum í tilrauninum skal færa rök fyrir þeim breytingum sem gerðar eru. Nota má aðra staðla ef nákvæmar tilvísanir til þeirra eru gefnar. Aðferðin, sem lýst er, byggist á notkun pólýstýrensýna með þekktri fjöldreifni (polydispersity) við kvörðun og vera má að henni þurfi að breyta svo að hún henti fyrir tiltekna fjölliður, t.d. vatnsleysanlegar fjölliður og fjölliður með löngum og greinóttum keðjum.

1.2. **Skilgreiningar og einingar**

Meðalmólmassinn, miðað við fjölda, M_n , og meðalmólmassinn, miðað við þyngd, M_w , er ákvarðaður með eftirfarandi jöfnum:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

þar sem

H_i er útslag nemans frá grunnlínunni fyrir viðstöðurummálið V_i ,

M_i er mólmassi fjölliðubáttarins við viðstöðurummálið V_i , og

n er fjöldi gagnapunkta.

Breidd mólmassadreifingarinnar, sem er mælikvarði á dreifni (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 staðall með ógreinóttum pólýstýrenkeðjum með þekktum mólmassa fyrir M_n og M_w og þekkta mólmassadreifingu á þröngu bili. Kvörðunarferilinn má eingöngu nota til að ákvarða mólmassa óþekktar sýnisins ef valin hafa verið sömu skilyrði við aðgreiningu sýnisins og staðlanna.

Ákvörðuð vensl milli mólmassans og rásrúmmálsins gilda einungis fyrir þau sértæku skilyrði sem ríkja í tiltekinni tilraun. Skilyrðin varða fyrst og fremst hitastigið, leysiefnið (eða leysablönduna), aðstæður við litskiljunina, skiljusúluna eða skiljusúlnakerfið.

Gildið, sem fæst þegar mólmassi sýnisins er ákvarðaður á þennan hátt, er afstætt og nefnist „pólýstýrenjafngildismólmassi“. Þetta merkir að mæld gildi fyrir mólmassa geta vikið meira eða minna frá algildunum og ræðst það af byggingarlegum og efnafræðilegum mun á sýnum og stöðlum. Ef aðrir staðlar eru notaðir, t.d. pólýetýlenglykól, pólýetýlenoxíð, pólýmetýlmetakrýlat eða pólýakrýlsýra, skal tilgreina ástæður þess.

1.4. Grundvöllur prófunaraðferðar

Ákvarða má bæði mólmassadreifingu sýnisins og meðalmólmassann (M_n og M_w) með því að beita gegndræpisskiljun. Gegndræpisskiljun er sérstök tegund vökvaskiljunar þar sem mismunandi efnisþættir sýnisins eru aðgreindir 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 gleypni útfjólublás ljóss og gefur einfaldan dreifingarferil. Til að geta ráðið í raunverulegan mólmassa út frá ferlinum er nauðsynlegt að kvarða súluna með því að láta fjölliður, sem hafa þekktan mólmassa og helst um það bil sömu byggingu, t.d. mismunandi pólýstýrenstaðla, fara gegnum súluna. Yfirleitt fæst normalferill sem er stundum dreginn út í stuttan hala á þeirri hlið sem mólmassinn er minni og lóðásinn gefur til kynna magn (út frá massa) sameinda með mismunandi mólmassa sem skolast út og láásinn sýnir lygrann af mólmassanum.

1.5. Gæðaviðmiðanir

Endurtekningarnákvæmni (hlutfallslegt staðalfrávik) rásrúmmálsins skal vera meiri en sem nemur 0,3%. Tryggja skal tilskilda endurtekningarnákvæmni efnagreiningarinnar með leiðréttingu með innri staðli ef skiljurit er unnið á grundvelli tíma og uppfyllir ekki framangreinda viðmiðun (1. heimild). Fjölddreifnin er komin undir mólmassa staðlanna. Ef um pólýstýrenstaðla er að ræða eru eftirfarandi gildi dæmigerð:

$$M_p < 2000 \quad M_w/M_n < 1,20$$

$$2000 \leq M_p \leq 10^6 \quad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \quad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p er mólmassi staðalsins við topphámark)

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. sýnainngjafarrúmmáli, seigju lausnarinnar og næmi nemans sem notaður er við greininguna. Stilla verður mesta sýnainngjafarrúmmál eftir lengd súlunnar til þess að forðast yfirálag. Heppilegt sýnainngjafarrúmmál við gegndræpisskiljun, þar sem súlan er 30 cm × 7,8 mm, er yfirleitt frá 40 og upp í 100 μ l. Nota má meira rúmmál en þó ætti aldrei að fara yfir 250 μ l. Ákvarða verður kjörhlutfall milli sýnainngjafarrúmmálsins og styrksins 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 nokkrum kringumstæðum að leysa það upp með því að nota úthljóðsbað. Ef nauðsyn krefur skal hreinsa sýnislausnina með himnusíu sem hefur opstærð milli 0,2 og 2,0 μm .

Greina verður frá tilvist óuppleystra agna í lokaskýrslunni þar eð þær geta stafað af sameindum með mikinn mólmassa. Nota skal viðeigandi aðferð til að ákvarða þyngdarhlutfall óuppleystra agna. Lausnirnar skulu notaðar innan sólarhrings.

1.6.3. *Búnaður*

- ílát undir leysiefni,
- afloftari (þar sem við á),
- dæla,
- púlsjafnari (þar sem við á),
- sýnainngjafarkerfi,
- súlur,
- 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 leiðslur úr stáli fyrir tetrahýdrófúran).

1.6.4. *Sýna- og leysainngjafarkerfi*

Ákveðið rúmmál sýnislausnar er sett á súluna, annaðhvort með sjálfvirkum sýnainngjafara eða handvirkt, á svæði þar sem eru skörp skil gagnvart ferðafasa. Breyting getur orðið á mældu mólmassadreifingunni ef bullan í sprautunni er dregin til baka eða ýtt fram of hratt ef það er gert handvirkt. Sýnainngjafarkerfið ætti, eftir því sem við verður komið, að vera laust við púlsa og helst vera búið púlsjafnara. Rennslis hraði 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 hindrunar-mörk). Val á skiljugeli eða lengd súlunnar ræðst bæði af eiginleikum sýnisins (straumfræðilegu rúmmáli og mólmassadreifingu) og sérstökum skilyrðum við skiljunina, t.d. þau sem varða leysiefni, hita og rennslis hraða (1., 2. og 3. heimild).

1.6.6. *Fræðilegir botnar*

Lýsa skal súlunni eða samsettu súlunum, sem eru notaðar við skiljunina, með því að tilgreina fjölda fræðilegu botnanna. Þetta felur í sér að þegar tetrahýdrófúran er útskolunarleysir 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 er fjöldi fræðilegra botna
- V_e er rásrúmmálið við topphámarkið
- W er breidd toppsins við grunnlínuna
- $W_{1/2}$ er breidd toppsins í miðri hæð.

1.6.7. *Aðskilnaðarhæfni*

Auk fjölda fræðilegra botna, sem er stærð sem ákvarðar bandbreiddina, skiptir aðskilnaðarhæfnin, sem ákvarðast af bratta kvörðunarferilsins, einnig máli. Aðskilnaðarhæfni fyrir súlu er gefin með eftirfarandi venslum:

$$\frac{V_{eM_x} - V_{e(10M_x)}}{\text{Þverskurðarflatarmál súlu}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

þar sem

V_{eM_x} er rásrúmmálið fyrir pólýstýren sem hefur mólmassann M_x

$V_{e(10M_x)}$ er rásrúmmálið fyrir pólýstýren sem hefur tífoldan mólmassa M_x .

Uplausn 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} eru gildi fyrir rásrúmmál tveggja pólýstýrenstaðla við topphámark

W_1 , W_2 eru gildi fyrir breidd toppanna við grunnlínu

M_1 , M_2 eru gildi fyrir mólmassa við topphámark (munur á gildunum ætti að vera tífoldur).

R-gildið fyrir súlakerfið 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 óhvarfgeimri 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 súlnnar.

1.6.9. *Hitastýring*

Hitastig í mikilvægum, innri hlutum búnaðarins (inngefjarlykkju, 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 súlnni. 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 ljósbrotsmælingu. Ef sérstakir eiginleikar sýnisins eða útskolunarleysisins krefjast þess má hins vegar nota aðrar gerðir nema, t.d. UV/VIS-, IR- eða seigjunema.

2. **GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF**2.1. **Gögn**

Nota skal DIN-staðal (1. heimild) að því er varðar nákvæmar 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 mólmassa þess staðals sem er notaður.

Að lokinni ákvörðun á mismunandi viðstöðurummáli eða viðstöðutímum (ef til vill leiðrétt með innri staðli) skal setja gildin fyrir $\log M_p$ (M_p er topphámark kvörðunarstaðalsins) á móti annarri þessara stærða. Nauðsynlegt er að hafa minnst tvo kvörðunarpunkta fyrir hvert tugbil fyrir mólmassa og minnst fimm mælipunktar þurfa að vera á heildarferlinum og þeir ættu að spanna áætlaðan mólmassa sýnisins. Endapunkturinn, sem sýnir minnsta mólmassa á kvörðunarferlinum, er skilgreindur með n-hexýlbenseni eða öðru viðeigandi, óskautuðu, uppleystu efni. Mólmassinn, bæði miðað við fjölda og miðað við massa, er yfirleitt ákvarðaður með rafrænni gagnavinnslu sem byggist á formúlunum í lið 1.2. Ef handvirkri úrvinnslu er beitt skal styðjast við ASTM D 3536-91 (3. heimild).

Dreifingarferillinn skal birtur sem tafla eða sem mynd (tíðnidreifing eða summa hundradshluta á móti $\log M$). Í grafisku framsetningunni skal hvert tugbil fyrir mólmassa að jafnaði vera um 4 cm á breidd og topphámarkið skal vera í um 8 cm hæð. Ef um tegurdreifingarferla er að ræða skal munur á lóðhnitum milli 0 og 100% vera um 10 cm.

2.2. Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. *Prófunarefni*

- fyrirliggjandi upplýsingar um prófunarefnið (eiginleikar, aukefni og óhreinindi),
- lýsing á meðhöndlun sýnisins, athuganir og vandamál.

2.2.2. *Tækjabúnaður*

- ílát undir skiljuvökva, eðallofttegund, afloftun skiljuvökvans og samsetning hans, óhreinindi,
- dæla, púlsjafnari, sýnainngjafarkerfi,
- skiljusúlur (framleiðandi, allar upplýsingar um eiginleika súlnanna, svo sem opstærð og tegund skiljuæfnis og fjöldi, lengd og röð súlnanna sem eru notaðar),
- fjöldi fræðilegra botna súlnunnar (eða súlnanna), aðskilnaðarhæfni (upplausn kerfisins),
- upplýsingar um samhverfu toppanna,
- hiti súlnanna, tegund hitastýringar,
- nemi (grundvöllur mæliaðferðar, tegund, rúmmál kúvettunnar),
- rennismælir, ef hann er notaður (framleiðandi, grundvöllur mæliaðferðar),
- riti og gagnavinnslubúnaður (vél- og hugbúnaður).

2.2.3. *Kvörðun kerfisins*

- nákvæm lýsing á þeirri aðferð sem er notuð til að gera kvörðunarferilinn,
- upplýsingar um gæðaviðmiðanir að því er varðar þessa aðferð (t.d. fylgnistuðull og fertölusumma frávíka),
- upplýsingar um hvers kyns útgiskun, ályktanir og námundun í tilrauninni og mat og úrvinnslu gagna,
- skylt er að skrá allar mælingar, sem gerðar eru til að gera 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,
 - sýnainngjafarrúmmál og sýnastyrkur,
 - M_p -gildi sem er notað við kvörðun,

- rásrúmmál eða leiðréttur viðstöðutími, mældur við topphámarkið,
- M_p -gildi sem er reiknað við topphámarkið,
- 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 rásrúmmálinu eða viðstöðutímanum,
- upplýsingar um viðmiðunarmörk matsins ef toppurinn hefur ekki verið greindur til fullnustu,
- lýsing á jöfnunaraðferðum, ef þær eru notaðar,
- aðferðir við að tilreiða og formeðhöndla sýnið,
- tilvist óuppleystra agna, ef um þær er að ræða,
- sýnainngjafarrúmmál (μ l) og sýnastyrkur (mg/ml),
- athuganir sem benda til áhrifa sem orsaka frávik frá ákjósanlegasta skiljuriti úr gegndræpisskiljun,
- nákvæm lýsing á öllum breytingum í tilhögun prófananna,
- nákvæmar upplýsingar um skekkjusvið,
- hvers kyns aðrar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3. HEIMILDIR:

- 1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, 1. hluti.
- 2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., og Bly, D.D. ritstj., (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.

Viðauki

Dæmi um aðrar aðferðir til að ákvarða meðalmólmassa, miðað við fjölda, fyrir fjölliður (M_n)

Gegndræpisskiljun (GPC) er ákjósanlegasta aðferð 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 þess er að vænta að efnið uppfylli ekki lögbundna viðmiðun fyrir M_n (sem þarf að staðfesta) má nota aðrar aðferðir, svo sem:

1. Aðferð sem styðst við safneiginleika

- 1.1. *Suðumarksmæling/frostmarksmæling*: mæling 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 mólmassa fjölliðunnar (1. og 2. heimild).

Notkunarsvið: $M_n < 20\,000$.

- 1.2. *Lækkun gufuþrýstings*: mæling á gufuþrýstingi tiltekins viðmiðunarvökva fyrir og eftir að í hann hefur verið bætt fjölliðu í ákveðnu magni (1. og 2. heimild).

Notkunarsvið: $M_n < 20.000$ (fræðilega; hefur takmarkað gildi í reynd).

- 1.3. *Osmósumæling*: byggist á lögmálinu um osmósu, þ.e. náttúrlegri tilhneigingu leysissameinda til að fara gegnum hálfgegndræpa himnu úr einni tiltekinni lausn yfir í aðra sem hefur meiri styrkleika þar til jafnvægi er komið á. Í prófuninni er styrkur þynnri lausnarinnar núll en sterkari lausnin inniheldur fjölliðuna. Þegar sameindir leysisins dragast gegnum himnuna skapast þrýstingsmunur sem er kominn undir styrknum og mólmassa fjölliðunnar (1., 3. og 4. heimild).

Notkunarsvið: M_n er frá 20 000 og upp í 200 000.

- 1.4. *Osmósumæling í gufufasa*: felst í samanburði á uppgufunarhraða úða af hreinum leysi við úða a.m.k. þriggja styrkblandna af fjölliðunni (1., 5. og 6. heimild).

Notkunarsvið: $M_n < 20\,000$.

2. Endahópagreining

Ef þessi aðferð er notuð er nauðsynlegt að þekkja bæði heildarbyggingu fjölliðunnar og eðli endahópa keðjunnar (og nauðsynlegt er að geta greint þá frá meginsameindinni, t.d. með segulómun (NMR), titrun eða afleiðumyndun). Ákvörðun á fjölda endahópa í hverri fjölliðusameind getur gefið gildi fyrir mólmassann (7. til 9. heimild).

Notkunarsvið: M_n allt að 50 000 (með minnkandi áreiðanleika).

HEIMILDIR:

- 1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). *Textbook of Polymer Science*, 3. útg., John Wiley, New York.
- 2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. 4. kafli. *Polymer Molecular Weights*, I. hluti, P.E. Slade, Jr. ritstj., 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. *Determination of Molecular Weight*, A.R. Cooper ritstj., 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. *Determination of Molecular Weight*, A.R. Cooper ritstj., John Wiley and Sons.
 - 7) Schröder, E., Möller, G. og Arndt, K-F. (1989). *Polymer Characterisation*, Carl Hanser Verlag, München.
 - 8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, 3. kafli. *Polymer Molecular Weights*, I. hluti, P.E. Slade, Jr. ritstj., Marcel Dekker, New York.
 - 9) Amiya, S. et al. (1990). *Pure and Applied Chemistry*, 62, 2139–2146.
-

III. VIÐAUKI B

A.19 SAMEINDIR MEÐ LÍTINN MÓLMASSA Í FJÖLLIDUM

1. **AÐFERÐ**

Þessi gegndræpisskiljun er sama aðferð og OECD TG 119 (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 mólmassa með öðrum aðferðum (sjá viðauka). Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem notuð er og rökstyðja notkun hennar.

Aðferðin, sem lýst er, byggist á DIN-staðli 55672 (1. heimild). Nákvæmar 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 lýst er, byggist á notkun pólýstýrensýna með þekktri fjöldreifni (polydispersity) við kvörðun og vera má að henni þurfi að breyta svo hún henti fyrir tiltekna fjölliður, t.d. vatnsleysanlegar fjölliður og fjölliður með löngum og greinóttum keðjum.

1.2. **Skilgreiningar og einingar**

Lítill mólmassi er samkvæmt skilgreiningu mólmassi undir 1000 daltonum.

Meðalmólmassinn, miðað við fjölda, M_n , og meðalmólmassinn, miðað við þyngd, M_w , er ákvarðaður með eftirfarandi jöfnum:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n H_i}{\sum_{i=1}^n H_i / M_i} \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^n H_i x M_i}{\sum_{i=1}^n H_i}$$

þar sem

H_i er útslag nemans frá grunnlínunni fyrir viðstöðurúmmálið V_i

M_i er mólmassi fjölliðubáttarins við viðstöðurúmmálið V_i og

n er fjöldi gagnapunkta.

Breidd mólmassadreifingarinnar, sem er mælikvarði á dreifni (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 mólmassa fyrir M_n og M_w og þekkta mólmassadreifingu á þröngu bili. Kvörðunarferilinn má eingöngu nota til að ákvarða mólmassa óþekktar sýnisins ef valin hafa verið sömu skilyrði við aðgreiningu sýnisins og staðlanna.

Ákvörðuð vensl milli mólmassans og rásrúmmálsins gilda einungis fyrir þau sértæku skilyrði sem ríkja í tiltekinni tilraun. Skilyrðin varða fyrst og fremst hitastigið, leysiefnið (eða leysablönduna), aðstæður við litskiljunina, skiljusúluna eða skiljusúlnakerfið.

Gildið, sem fæst þegar mólmassi sýnisins er ákvarðaður á þennan hátt, er afstætt og nefnist „pólýstýrenjafngildismólmasi“. Þetta merkir að mæld gildi fyrir mólmassa geta vikið meira eða minna frá algildunum og ræðst það af byggingarlegum og efnafræðilegum mun á sýnum og stöðlum. Ef aðrir staðlar eru notaðir, t.d. pólýetýlenglykól, pólýetýlenoxíð, pólýmetýlmetakrylát eða pólýakrylsýra, skal tilgreina ástæður þess.

1.4. Grundvöllur prófunaraðferðar

Ákvarða má bæði mólmassadreifingu sýnisins og meðalmólmassann (M_n og M_w) með því að beita gegndræpisskiljun. Gegndræpisskiljun er sérstök tegund vökvaskiljunar þar sem mismunandi efnisþættir sýnisins eru aðgreindir 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 gleypni útfjólublás ljóss og gefur einfaldan dreifingarferil. Til að geta ráðið í raunverulegan mólmassa út frá ferlinum er nauðsynlegt að kvarða súluna með því að láta fjöllidur, sem hafa þekktan mólmassa og helst um það bil sömu byggingu, t.d. mismunandi pólýstýrenstaðla, fara gegnum súluna. Yfirleitt fæst normalferill sem er stundum dreginn út í stuttan hala á þeirri hlið sem mólmassinn er minni og lóðásinn gefur til kynna magn (út frá massa) sameinda með mismunandi mólmassa sem skolast út og láásinn sýnir lygrann af mólmassanum.

Innihald efnisþátta með lítinn mólmassa er fundið út frá þessum ferli. Útreikningarnir geta því aðeins verið nákvæmir að innihald efnisþátta með lítinn mólmassa jafngildi massa fjöllidunnar í heild.

1.5. Gæðaviðmiðanir

Endurtekningarnákvæmni (hlutfallslegt staðalfrávik) rásrúmmálsins skal vera meiri en sem nemur 0,3%. Tryggja skal tilskilda endurtekningarnákvæmni efnagreiningarinnar með leiðréttingu með innri staðli ef skiljurit er unnið á grundvelli tíma og uppfyllir ekki framangreinda viðmiðun (1. heimild). Fjöldreifnin er komin undir mólmassa staðlanna. Ef um pólýstýrenstaðla er að ræða eru eftirfarandi gildi dæmigerð:

$$M_p < 2\,000 \quad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \quad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \quad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p er mólmassi staðalsins við topphámark.)

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. sýnainngjafarrúmmáli, seigju lausnarinnar og næmi nemans sem notaður er við greininguna. Stilla verður mesta sýnainngjafarrúmmál eftir lengd súlnnar til þess að forðast yfirálag. Heppilegt sýnainngjafarrúmmál við gegndræpisskiljun þar sem súlan er 30 cm × 7,8 mm er yfirleitt frá 40 og upp í 100 µl. Nota má meira rúmmál en þó ætti aldrei að fara yfir 250 µl. Ákvarða verður kjörhlutfall milli sýnainngjafarrúmmálsins og styrksins áður en kemur að eiginlegri kvörðun súlnnar.

1.6.2. *Tilreiðsla sýnislausnarinnar*

Í meginatriðum gilda framangreindar kröfur einnig um tilreiðslu sýnislausna. Sýnið er leyst upp í heppilegum leysi, t.d. tetrahýdrófurani (THF), með því að hrista lausnina vandlega. Ekki ætti undir nokkrum kringumstæðum að leysa það upp með því að nota úthljóðsbað. Ef nauðsyn krefur skal hreinsa sýnislausnina með himnusíu sem hefur opstærð milli 0,2 og 2,0 µm.

Greina verður frá tilvist úppleystra agna í lokaskýrslunni þar eð þær geta stafað af sameindum með mikinn mólmassa. Nota skal viðeigandi aðferð til að ákvarða þyngdarhlutfall úppleystra agna. Lausnirnar skulu notaðar innan sólarhrings.

1.6.3. *Leiðrétting vegna innihalds óhreininda og aukefna*

Leiðrétting fyrir efnisþætti með $M < 1000$ vegna hlutdeildar sérstakra efnisþátta, sem eru ekki fjölliður, (t.d. óhreininda og/eða aukefna) er að jafnaði nauðsynleg nema ef mælingar hafa þegar sýnt að magn þeirra er $< 1\%$. Upplýsingar um þetta fást með beinni greiningu á fjölliðulausninni eða skolvökvanum í gegndræpisskiljuninni.

Ef styrkur skolvökvens í ferðafasa, 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 skolvökvan gufa algerlega upp og leysa upp á ný það sem eftir verður. Styrking skolvökvens verður að gerast við slík skilyrði að tryggt sé að engar breytingar eigi sér stað í honum. Meðhöndlun skolvökvens að lokinni gegndræpisskiljuninni ræðst af því hvaða greiningaraðferð er beitt við magnákvörðunina.

1.6.4. *Búnaður*

Í gegndræpisbúnaðinum eru eftirfarandi hlutir:

- ílát undir leysiefni,
- afloftari (þar sem við á),
- dæla,
- púlsjafnari (þar sem við á),
- sýnainngjafarkerfi,
- súlur,
- 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 leiðslur úr stáli fyrir tetrahýdrófurán).

1.6.5. *Sýna- og leysainngjafarkerfi*

Ákveðið rúmmál sýnislausnar er sett á súluna, annaðhvort með sjálfvirkum sýnainngjafara eða handvirkt, á svæði þar sem eru skörp skil gagnvart ferðafasa. Breyting getur orðið á mældu mólmassadreifingunni ef bullan í sprautunni er dregin til baka eða ýtt fram of hratt, ef það er gert handvirkt. Leysainngjafarkerfið ætti, eftir því sem við verður komið, að vera laust við púlsa og helst vera búið púlsjafnara. Rennslis hraði 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 súlufna með skilgreinda eiginleika (t.d. opstærð og hindrunarmörk). Val á skiljugeli eða lengd súlunnar ræðst bæði af eiginleikum sýnisins (straumfræðilegu rúmmáli og mólmassadreifingu) og sérstökum skilyrðum við skiljunina, t.d. þau sem varða leysiefni, hita og rennslis hraða (1., 2. og 3. heimild).

1.6.7. *Fræðilegir botnar*

Lýsa skal súlunni eða samsettu súlunum, sem eru notaðar við skiljunina, með því að tilgreina fjölda fræðilegu botnanna. Þetta felur í sér að þegar tetrahýdrófúran er útskolunarleysir 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 er fjöldi fræðilegra botna
- V_e er rásrúmmálið við topphámarkið
- W er breidd toppsins við grunnlínuna
- $W_{1/2}$ er breidd toppsins í miðri hæð.

1.6.8. *Aðskilnaðarhæfni*

Auk fjölda fræðilegra botna, sem er stærð sem ákvarðar bandbreiddina, skiptir aðskilnaðarhæfnin, sem ákvarðast af bratta kvörðunarferilsins, einnig máli. Aðskilnaðarhæfni fyrir súlu er gefin með eftirfarandi venslum:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{þverskurðarflatarmál súlu}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

þar sem

- V_{e,M_x} er rásrúmmálið fyrir pólýstýren sem hefur mólmassann M_x
- $V_{e,(10M_x)}$ er rásrúmmálið fyrir pólýstýren sem hefur tífalda mólmassa M_x .
- 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} eru gildi fyrir rásrúmmál tveggja pólýstýrenstaðla við topphámark
- W_1 , W_2 eru gildi fyrir breidd toppanna við grunnlínu
- M_1 , M_2 eru gildi fyrir mólmassa við topphámark (munur á gildunum ætti að vera tífoldur).
- R-gildið fyrir súlakerfið ætti 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 umlukði óhvarfgejarri 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

Hitastíg í mikilvægum, 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 súlnni. 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 μ l, nema þegar um er að ræða ljósdreifingar- og seigjunema. Við greininguna er venjulega beitt ljósbrotsmælingu. Ef sérstakir eiginleikar sýnisins eða útskolunarleysisins krefjast þess má hins vegar nota aðrar gerðir nema, t.d. UV/VIS-, IR- eða seigjunema.

2. GÖGN OG SKÝRSLUGJÖF

2.1. Gögn

Nota skal DIN-staðal (1. heimild) að því er varðar nákvæmar 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 núllsýni sem hafa verið meðhöndluð við sömu skilyrði og sýnið sjálft.

Nauðsynlegt er að tilgreina skilmerkilega að mæld gildi séu hlutfallsleg gildi sem svara til mólmassa þess staðals sem er notaður.

Að lokinni ákvörðun á mismunandi viðstöðurummáli eða viðstöðutímum (ef til vill leiðrétt með innri staðli) skal setja gildin fyrir $\log M_p$ (M_p er topphámark kvörðunarstaðalsins) á móti annarri þessara stærða. Nauðsynlegt er að hafa minnst tvo kvörðunarpunkta fyrir hvert tugbil fyrir mólmassa og minnst fimm mælipunktar þurfa að vera á heildarferlinum og þeir ættu að spanna áætlaðan mólmassa sýnisins. Endapunkturinn, sem sýnir minnsta mólmassa á kvörðunarferlinum, er skilgreindur með n-hexýlbenseni eða öðru viðeigandi, óskautuðu, uppleystu efni. Sá hluti ferilsins, sem svarar til mólmassa undir 1000, er ákvarðaður og leiðréttur með tilliti til óhreininda og aukefna. Skiljúlínuritín eru að jafnaði metin með rafrænni gagnavinnslu. Ef handvirkri úrvinnslu er beitt skal styðjast við ASTM D 3536-91 (3. heimild).

Ef einhver óleysanleg fjölliða situr eftir á súlnni er líklegt að mólmassi hennar sé meiri en leysanlega hlutans og ef ekki er tekið tillit til hennar yrði það til þess að sá hluti innihaldsins, sem hefur lítinn mólmassa, yrði ofmetinn. Leiðbeiningar um leiðréttingu, að því er varðar innihald efnisþátta með lítinn mólmassa í óleysanlegri fjölliðu, eru gefnar í viðaukanum.

Dreifingarferillinn skal birtur í töfluformi eða sem mynd (tíðnidreifing eða summa hundradshluta á móti $\log M$). Í grafísku framsetningunni skal hvert tugbil fyrir mólmassa að jafnaði vera um 4 cm á breidd og topphámarkið skal vera í um 8 cm hæð. Ef um tegurdreifingarferla er að ræða skal munur á lóðhnitum milli 0 og 100% vera um 10 cm.

2.2. Prófunarskýrsla

Eftirtaldar upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

2.2.1. Prófunarefni

- fyrirleggjandi upplýsingar um prófunarefnið (eiginleikar, aukefni og óhreinindi),
- lýsing á meðhöndlun sýnisins, athuganir og vandamál.

2.2.2. Tækjabúnaður

- ílát undir skiljuvökva, eðallofttegund, afloftun skiljuvökvans og samsetning hans, óhreinindi,
- dæla, púlsjafnari, sýnainngjafarkerfi,
- skiljusúlur (framleiðandi, allar upplýsingar um eiginleika súlnanna, svo sem opstærð, tegund skiljuefnis o.s.frv., fjöldi, lengd og röð súlnanna sem eru notaðar),
- fjöldi fræðilegra botna súlnunnar (eða súlnanna), aðskilnaðarhæfni (upplausn kerfisins),
- upplýsingar um samhverfu toppanna,
- hiti súlnanna, hitastýring,
- nemi (grundvöllur mæliaðferðar, tegund, rúmmál kúvettunnar),
- rennismælir, ef hann er notaður (framleiðandi, grundvöllur mæliaðferðar),
- riti og gagnavinnslubúnaður (vél- og hugbúnaður).

2.2.3. Kvörðun kerfisins

- nákvæm lýsing á þeirri aðferð sem er notuð til að gera kvörðunarferilinn,
- upplýsingar um gæðaviðmiðanir að því er varðar þessa aðferð (t.d. fylgnistuðull og fertölusumma frávíka),
- upplýsingar um hvers kyns útgiskun, ályktanir og námundun í tilrauninni og mat og úrvinnslu gagna,
- skylt er að skrá allar mælingar, sem gerðar eru til að gera 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,
 - sýnainngjafarrúmmál og sýnastyrkur,
 - M_p -gildi sem er notað við kvörðun,
 - rásrúmmál eða leiðréttur viðstöðutími mældur við topphámarkið,
 - M_p -gildi sem er reiknað við topphámarkið,
 - skekkja í reiknaða M_p -gildinu og kvörðunargildinu í hundraðshlutum.

2.2.4. Upplýsingar um innihald efnisþátta með lítinn mólmassa

- lýsing á þeirri aðferð sem er notuð í greiningunni og framkvæmd tilraunanna,
- upplýsingar um hundraðshluta efnisþátta með lítinn mólmassa (massahlutfall) í heildarsýninu,
- upplýsingar um óhreinindi, aukefni og aðra efnisþætti, sem eru ekki fjölíður, gefið sem massahlutfall 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 rásrúmmálinu eða viðstöðutímanum,
- upplýsingar um viðmiðunarmörk matsins ef toppurinn hefur ekki verið greindur til fullnustu,
- lýsing á jöfnunaraðferðum, ef þær eru notaðar,

- aðferðir við að tilreiða og formeðhöndla sýnið,
- tilvist óuppleystra agna, ef um þær er að ræða,
- sýnainngjafarrúmmál (μl) og sýnastyrkur (mg/ml),
- athuganir sem benda til áhrifa sem orsaka frávik frá ákjósanlegasta sniðriti úr gegndræpisskiljun,
- nákvæm lýsing á öllum breytingum í tilhögun prófananna,
- nákvæmar upplýsingar um skekkjusvið,
- hvers kyns aðrar upplýsingar og athugasemdir sem skipta máli við túlkun niðurstaðna.

3. **HEIMILDIR:**

- 1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, 1. hluti.
 - 2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. og Bly, D.D. ritstj. (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.
-

*Viðauki***Leiðbeiningar um hvernig innihald efnisþátta með lítinn mólmassa 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 er fasti ljósbrotsmælisins (í mikróvoltsekúndum/ml)
R er útslag pMMA-staðalsins (í mikróvoltsekúndum)
C er styrkur pMMA-staðalsins (í mg/ml)
V er inngjafarrúmmálið (í ml) og
dn/dc er hækkun á ljósbrotstuðli pMMA í tetrahýdrófúrani (í mg/ml).

Eftirfarandi gögn eru dæmigerð fyrir pMMA-staðal:

- R = 2 937 891
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.

III. VIÐAUKI C

A.20. LEYSNI/ÚTDRAGANLEIKI FJÖLLIÐNA Í VATNI

1. **ADFERÐ**

Aðferðin, sem hér er lýst, er sú sama og endurskoðaða útgáfan af OECD TG 120 (1997). Frekari tæknilegar upplýsingar eru gefnar í 1. heimild.

1.1. **Inngangur**

Fyrir tiltekna fjölliður, svo sem 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 leysnina/útdraganleikann með hjálp annarra aðferða. Í slíkum tilvikum skal gefa ítarlegar upplýsingar um þá aðferð sem notuð er og rökstyðja notkun hennar.

1.2. **Viðmiðunarefni**

Engin.

1.3. **Grundvöllur prófunaraðferðar**

Leysni/útdraganleiki fjölliðnanna í vatni er ákvarðaður með flöskuaðferðinni (sjá A.6 vatnsleysni, flöskuaðferð) með þeim breytingum sem er lýst hér fyrir aftan.

1.4. **Gæðaviðmiðanir**

Engar.

1.5. **Lýsing á prófunaraðferðinni**1.5.1. *Búnaður*

Aðferðin krefst eftirfarandi búnaðar:

- mólunartæki, t.d. kvörn sem skilar ögnum með þekktri stærð,
- hristibúnaður með möguleika til hitastýringar,
- himnusúkerfi,
- greiningartæki við hæfi,
- stöðluð sigti.

1.5.2. *Tilreiðsla 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. *Framkvæmd*

Þrjú sýni prófunarefnisins, hvert 10 g, eru sett hvert í sína glerflösku með glertappa og 1000 ml af vatni er bætt við í hverja flösku. Ef erfitt er í framkvæmd að meðhöndla 10 g af fjölliðunni skal nota mesta magn sem unnt er að meðhöndla með góðu móti og stilla rúmmál vatnsins í hlutfalli við það.

Loka skal flöskunum tryggilega og hrista þær síðan við 20 °C. Nota skal hristi- eða hræribúnað sem getur unnið við stöðugt hitastig. Að liðnum 24 klst. skal sía innihald hverrar flösku 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 heildarleysnina eða heildarútdraganleikann út frá þurrviggt þess efnis, sem situr eftir í siunni, eða botnfallinu sem fellur til við skiljunina.

Að jafnaði er nauðsynlegt að greina tölulega milli óhreinindanna og aukefnanna annars vegar og efnisþátta með lítinn mólmassa hins vegar. Ef þyngdarmælingu er beitt er enn fremur mikilvægt að gera núllsýnisprófun þar sem ekkert prófunarefni er notað svo að taka megi tillit til efnisleifa úr tilrauninni sjálfri.

Ákvarða má leysni/útdraganleika fjölliðna í vatni við 37 °C og pH 2 og pH 9 á sama hátt og lýst er hér að framan fyrir framkvæmd tilraunarinnar við 20 °C. Stilla má rétt sýrustig með því að bæta í lausnina annaðhvort heppilegum jafna eða viðeigandi síru, t.d. saltsýru eða ediksýru, eða basa, t.d. natríum- eða kalíumhýdroxíði eða NH₃, með hreinleika sem krafist er til efnagreininga.

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. Framkvæma skal aðra prófun standi slíkar aðferðir hins vegar ekki til boða og ákvörðun á leysni/útdraganleika fjölliðunnar einskorðast við óbeina greiningu sem felst í að ákvarða eingöngu heildarmagn lífræns kolefnis í vatnsfasanum. Þessi viðbótarprófun skal framkvæmd með þremur sýnum þar sem notaður er tundi 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 má við óbeinni greiningu á uppleystu eða útdregnu fjölliðuþáttunum með því að ákvarða heildarmagn leysanlegu efnisþáttanna og leiðréttu fyrir efnisþætti sem eru ekki fjölliður.

Greining á vatnsfasanum með tilliti til heildarinnihalds fjölliðuefnisþátta getur:

annaðhvort byggst á nægilega næmri aðferð, t.d.

- ákvörðun á heildarmagn lífræns kolefnis með sundrun í CO₂ með persúlfati eða díkrómati og mælingu með innroðagreiningu eða efnagreiningu,
- frumeindagleypmælingu (AAS) eða jafngildi hennar, rafgasljómun (IPC), fyrir fjölliður sem í er kisill eða málmur,
- útblámagleypmælingu (UV absorption) eða flúrskinsmælingu fyrir arýlfjölliður,
- vökvaskiljun-massagreiningu (LC-MS) fyrir sýni með litlum mólmassa,

eða á því að láta vatnskennda útdráttarvökvann gufa upp í lofttæmi og beita síðan litrófsgreiningu (IR, UV o.s.frv.) eða frumeindagleypmælingu/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 leysni/útdraganleika fjölliðunnar sjálfar.

Ef tiltölulega mikið er af slíkum eignum getur verið nauðsynlegt að greina leifarnar með hágæðavökvaskiljun 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/dregst ekki út. Ef leifar fjölliðu sitja eftir innan í einhverri flasknanna þegar þær hafa verið settar í skilvindu eða innihaldið síað skal hreinsa flöskuna með síuvökvanum þar til allar sýnilegar leifar eru horfnar. Síðan skal síuvökvinn síaður á ný eða undinn í skilvindu. Leifarnar, sem sitja eftir í síunni eða í skilvinduglasinu, skulu þurrkaðar við 40 °C í lofttæmi og vegnar. Þurrka skal leifarnar þar til massinn er orðinn stöðugur.

2. GÖGN

2.1. Prófun með aðeins einni stærð sýnis

Tilgreina skal niðurstöður fyrir allar flöskurnar þrjár, svo og meðalgildi, og þær skal gefa í einingunum massi á rúmmál lausnar (að jafnaði mg/l) eða massi á massa fjölliðusýnis (að jafnaði mg/g). Auk þess skal tilgreina massatap sýnisins (reiknað sem massi uppleysts efnis, deilt með massa 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 gefur það til kynna að allir útdraganlegir efnisþættir hafi dregist út í reynd. Ef sú er raunin telst bein greining að öllu jöfnu óþörf.

Massa leifanna skal hverju sinni gefa upp sem hundraðshluta af upphaflegum massa sýnisins. Meðaltöl skulu reiknuð í hverri tilraun. Mismunurinn milli 100 og hundraðshlutans, sem fundinn var, jafngildir innihaldi 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 (eiginleikar, aukefni og óhreinindi og innihald efnisþátta með lítinn mólmassa).

3.1.2. *Tilraunaskilyrði*

— lýsing á vinnuaðferðum 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 óhreininda, aukefna o.s.frv.,

— niðurstöður um leysni/útdraganleika í mg/g fjölliðu,

— gildi fyrir heildarmagn lífræns kolefnis í vatnsútdrættinum, massi uppleysta efnisins og reiknaður hundraðshluti, ef hann er mældur,

- sýrustig hvers sýnis,
- upplýsingar um gildi í núllsýnisprófunum,
- 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 Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.
-

III. VIÐAUKI D

C.13 LÍFÞÉTTNI: GEGNUMSTREYMISPRÓFUN MED FISKI

1. AÐFERÐ

Þessi lífþéttniaðferð er sama aðferð og OECD TG 305 (1996).

1.1. Inngangur

Í þessari aðferð er lýst tilhögun við að greina lífþéttnimátt efna í fiski við gegnumstreymi. Þótt gegnumstreymisprófanir séu æskilegastar er heimilt að nota hálfkyrrstöðuprófanir svo fremi þær uppfylli gildisviðmiðanirnar.

Aðferðinni er lýst svo skilmerkilega að unnt er að framkvæma hana og hafa þó nægilegt svigrúm til að laga tilhögun tilraunarinnar að þeim aðstæðum, sem eru fyrir hendi á viðkomandi rannsóknarstofum, svo og sérstökum eiginleikum prófunarefnanna. Aðferðin hentar fyrst og fremst 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 $P_{ow} > 6,0$). Lífþéttnistuðullinn (BCF), sem er áætlaður fyrir fram, stundum táknaður K_B , fyrir mjög fitusækin efni af því tagi verður að öllum líkindum hærri en lífþéttnistuðullinn í stöðugu ástandi (BCF_{SS}) sem vænta má að fái við tilraunir á rannsóknarstofu. Reikna má fyrir fram áætlaðan lífþéttnistuðul fyrir lífræn efnasambönd með log P_{ow} -gildi allt að 9,0 með jöfnu Binteins o.fl. (2. heimild). Breytistærðirnar, sem lýsa eðli lífþéttnimáttarins, eru m.a. fasti fyrir upptökuhraða (k_1), fasti fyrir útskilnaðarhraða (k_2) og BCF_{SS} .

Notkun geislamerkra prófunarefna getur auðveldað greiningu vatns- og fisksýna og komið að gagni við ákvörðun á því hvort fram skuli fara sanngreining og mæling á niðurbrotsefnum. Ef allar geislavirkar leifar eru mældar (t.d. með bruna eða með því að leysa upp vef) byggist lífþéttnistuðullinn á upphaflega efnasambandinu, öllum umbrotsefnum, sem eftir verða, og tillífuðu kolefni. Lífþéttnistuðlar, sem byggjast á öllum geislavirkum leifum, eru því ekki beint samanburðarhæfir við lífþéttnistuðul sem er fundinn með sértækri efnagreiningu á upphaflega efnasambandinu einu.

Við rannsóknir með geislamerktum efnum má beita tiltekinni sýnameðhöndlun til að ákvarða lífþéttnistuðul sem byggist á upphaflega efnasambandinu 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/upsöfnun 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) á hverjum tímamarki í upptökufasa þessarar uppsöfnunarprófunar er styrkur prófunarefnisins í eða á fiskinum eða tilteknum vefjum hans (C_f í $\mu\text{g/g}$ (milljónarhlutum)), deilt með styrk efnisins í umhverfi hans (C_w í $\mu\text{g/ml}$ (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.

Slétta eða stöðugt ástand næst þegar ferillinn fyrir magn prófunarefnisins í fiski (C_f) á móti tíma verður samsíða tímaásum 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 $\pm 20\%$ og enginn marktækur munur er á sýnatökutímabilunum þremur. Þegar sameinuð sýni eru greind þurfa hið minnsta fjórar greiningar að fara fram í röð. Ef upptaka prófunarefnanna er hægt er æskilegt að sjö dagar líði milli þess að sýni séu tekin.

Lífþéttistuðull, sem er reiknaður beint frá hraðaföstum (k_1/k_2), kallast hraðafraðilegur þéttistuðull, BCF_k .

Deilistuðull fyrir oktanól-vatn (P_{ow}) er hlutfallið milli leysni efnis í n-oktanóli og vatni við jafnvægi (aðferð A.8), einnig táknað K_{ow} . Lygrinn af P_{ow} er notaður sem vísbending um þá lífþéttni sem efni getur náð í vatnalífverum.

Verkunar- eða upptökufasi er sá tími sem fiskurinn er í snertingu við prófunarefnið.

Fastinn fyrir upptökuhraða (k_1) er tölulega gildið sem ákvarðar hversu hratt styrkur prófunarefnisins eykst í eða á fiskinum sem er til prófunar (eða tilteknum vefjum hans) þegar fiskurinn er látinn vera í snertingu við efnið (k_1 er gefinn upp sem dagar⁻¹).

Eftirfasi verkunar eða útskilnaðarfasi er tíminn eftir að prófunarfiskurinn hefur verið fluttur úr umhverfi með prófunarefninu til umhverfis sem er án þess efnis en þá fer fram rannsókn á útskilnaði (eða hreinu tapi) efnisins úr fiskinum (eða tilteknum vefjum hans) sem er til prófunar.

Fastinn fyrir útskilnaðarhraða (k_2) er tölulega gildið sem ákvarðar hversu hratt styrkur prófunarefnisins minnkar í eða á prófunarfiskinum (eða tilteknum vefjum hans) eftir að fiskurinn hefur verið fluttur úr umhverfi með prófunarefninu yfir í umhverfi sem er án þess efnis (k_2 er gefinn upp sem dagar⁻¹).

1.3. Grundvöllur prófunaraðferðar

Prófunin skiptist í tvo fasa: verkunarfasa (upptökufasa) og eftirfasi verkunar (útskilnaðarfasa). Í upptökufasanum eru mismunandi hópar fiska sömu tegundar látnir vera í snertingu við prófunarefnið í a.m.k. tveimur styrkleikum. Þeir eru síðan fluttir í umhverfi sem er laust við prófunarefnið og þá hefst útskilnaðarfasin. Útskilnaðarfasi er ávallt nauðsynlegur nema upptaka efnisins í upptökufasanum hafi verið óveruleg (t.d. ef lífþéttistuðullinn er minni en 10). Fylgst er með styrk prófunarefnisins í eða á fiskinum (eða tilteknum vefjum hans) í báðum fösum prófunarinnar. Auk þess að hafa tvo mismunandi styrkleika er jafnframt hæður samburðarhópur fiska við sömu aðstæður og í prófuninni, að öðru leyti en því að prófunarefnið er ekki í umhverfi þeirra, til að tengja hugsanleg, skaðleg áhrif í lífþéttiprófuninni við samsvarandi samburðarhóp 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. viðauka má spá fyrir um lengd upptökufasans og hversu langur tími líður þar til stöðugt ástand er komið á. Útskilnaðartímabilið hefst síðan þegar fiskurinn er fluttur í annað hreint ílát þar sem er sams konar umhverfi en án prófunarefnisins. Ef unnt er skal reikna lífþéttistuðulinn bæði sem hlutfallið (BCF_{SS}) milli styrksins í fiskinum (C_f) og vatninu (C_w) við stöðugt ástand og sem hraðafraðilegan lífþéttistuðul (BCF_k) sem hlutfallið milli hraðafastanna fyrir upptöku (k_1) og útskilnað (k_2) þar sem gert er ráð fyrir hraðafraði af fyrstu gráðu. Ef augljóst er að hraðafraðin er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (5. viðauki).

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 útskilnaðarfasin.

Fastinn fyrir upptökuhraðann, fastinn fyrir útskilnaðarhraðann (eða fastar þar sem flóknari líkön koma við sögu), lífþéttistuðullinn og, þar sem unnt er, öryggismörk fyrir hverja þessara breytistærða eru reiknuð út frá því líkani sem lýsir best mældum styrk prófunarefnisins í fiskinum og vatninu.

Lífþéttistuðullinn er gefinn sem fall af heildarblautvigt fisksins. Í sérstökum tilvikum má nota tiltekna vefi eða líffæri (t.d. vöðva eða lifur) ef fiskurinn er nægilega stór eða skipta má fiskinum í ætan hluta (flak) og óætan hluta (innfyli). Fyrir mörg lífræn efni eru skýr tengsl milli lífþéttnimáttarins og fitusækni efnisins og því eru samsvarandi tengsl milli fituhlutfalls prófunarfiskanna og mældrar lífþéttni þessara efna. Til að draga úr breytileika af þessum toga í niðurstöðum prófananna fyrir mjög fitusækin efni (þ.e. með $\log P_{ow} > 3$) skal gefa lífþéttina bæði í hlutfalli við fituinnihaldið og í hlutfalli við heildarlíkamsþyngdina.

Fituinnihaldið skal ákvarðað fyrir sama lífsýnið og er notað 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:

- a) leysni í vatni,
- b) deilistuðull fyrir oktanól-vatn, P_{ow} (einnig gefinn sem K_{ow} , ákvarðaður með hágæðavökvaskiljun í A.8),
- c) vatnsrof,
- d) ljósnidurbrot í vatni, ákvarðað í sól eða með eftirlíkingu sólargeislunar og við sömu geislunarskilyrði og ríkja í lífþéttniprófuninni (3. heimild),
- e) yfirborðsspenna (þ.e. fyrir efni þar sem ekki er unnt að ákvarða $\log P_{ow}$),
- f) gufuþrýstingur,
- g) auðlifbrjótanleiki (þar sem við á).

Aðrar nauðsynlegar upplýsingar varða eiturhrif gagnvart þeirri fisktegund sem er notuð í prófuninni, einkum aðfella miðgildisbanastyrkinn LC_{50} (þ.e. óháð tíma). Fyrir þarf að liggja efnagreiningaraðferð við hæfi, með þekktri nákvæmni, samkvæmni og næmi, fyrir ákvörðun á magni prófunarefnisins í prófunarlausnunum og í lífsýninu ásamt upplýsingum um tilreiðslu og geymslu sýnisins. Einnig þarf að liggja fyrir vitneskja um greiningarmörk prófunarefnisins bæði í vatni og fiskvefjum. Þegar notuð eru geislaþermt prófunarefni (^{14}C) skal liggja fyrir hve stór hundraðshluti geislavirkninnar tengist óhreinindum.

1.5. **Gildi prófunarinnar**

Prófunin telst gild ef eftirfarandi skilyrði eru uppfyllt:

- frávik í hitastigi er minna en ± 2 °C,
- styrkur uppleysts súrefnis fer ekki undir 60% mettunarmörk,
- styrkur prófunarefnisins í hólfunum skal vera ± 20 % af meðaltali mældra gilda í upptökufasanum,
- dánarhlutfall eða hlutfall fiska, sem verða fyrir öðrum neikvæðum áhrifum eða sjúkdómum, skal ekki vera hærra en 10% í lok prófunarinnar, hvorki í samanburðarhópi né hjá meðhöndluðum fiski. Ef prófunin er framlengd þannig að hún vari nokkrar vikur eða mánuði skal dánarhlutfall fiska eða hlutfall fiska, sem verða fyrir öðrum skaðlegum áhrifum, ekki vera hærra en 5% á mánuði og ekki hærra en 30% í heild.

1.6. **Viðmiðunarefni**

Notkun viðmiðunarefna með þekktum lífþéttnimætti getur, ef með þarf, komið að gagni við eftirlit með tilhögun tilraunarinnar. Enn er þó ekki unnt að mæla með neinum sérstökum efnum.

1.7. **Lýsing á prófunaraðferðinni**

1.7.1. *Búnaður*

Fyrir alla hluta búnaðarinnar skal forðast að nota efni sem hætta er á að leysist upp, í- eða ásogi efni eða leki þeim og hafi skaðleg áhrif á fiskinn. Nota má venjuleg, réttþyrnd eða sívöl ílát úr efnafræðilega hvarftregu efni og af hæfilegri stærð miðað við magn fisksins. Halda skal notkun mjúkra plastslangna í lágmarki. Æskilegast er að nota teflon (R), ryðfrítt stál og/eða glerrör. Reynslan hefur leitt í ljós að ef um efni er að ræða sem hafa háan gleypnistuðul, svo sem tilbúin pípretróid, getur verið nauðsynlegt að nota sílanhúðað gler. Í slíkum tilvikum verður að fleygja búnaðinum að lokinni notkun.

1.7.2. Vatn

Venjulegt vatn er að jafnaði notað við prófunina og skal vera með jöfnum gæðum og ómengi. 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, dafnað og æxlast í þynningarvatninu (t.d. í rannsóknarstofueldi eða eiturhrifaþrófun sem nær til alls æviskeiðsins). Eiginleikar vatnsins skulu ákvarðaðir, a.m.k. að því er varðar sýrustig, hörku, heildarmagn fastra efna, heildarmagn lífræns kolefnis og helst líka að því er varðar ammoníum, nitrít og basastig og seltu ef um sjávarfiska er að ræða. Þótt það sé vel þekkt hvaða þættir eru mikilvægir til að fiskurinn þrífist vel er í 1. viðauka að finna ráðlagt hámarksgildi að því er varðar styrk ýmissa efnaþátta við tilraunir í ferskvatni og sjó.

Gæði vatns skulu vera stöðug allan prófunartímann. Sýrustigið skal vera á bilinu 6,0 til 8,5 en í hverri prófun skal frávik þess ekki vera meira en $\pm 0,5$ 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. Innihald þungmálma (t.d. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd og Ni), helstu plúsjóna og mínusjóna (t.d. Ca, Mg, Na, K, Cl og SO₄) og varnarefna (t.d. heildarmagn fosfórlífrænna og klórlífrænna varnarefna), heildarmagn lífræns kolefnis og heildarmagn svifagna skal ákvarðað 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 athuganir verið strjálí (t.d. á sex mánaða fresti).

Náttúrlegur styrkur agna og heildarmagn lífræns kolefnis í þynningarvatninu skal vera sem minnst til að forðast að lífrænt efni sögi í sig prófunarefni sem gæti skert lífaðgengi prófunarefnisins (4. heimild). Viðunandi hámarksgildi er 5 mg/l fyrir agnir (þurrefni sem fer ekki gegnum 0,45 μ m síu) og 2 mg/l fyrir heildarmagn lífræns kolefnis (sjá 1. viðauka). Vatnið skal síað fyrir notkun ef þörf krefur. Magn lífræns kolefnis í vatninu, sem rekja má til fisksins (úrgangsefni) og fæðuleifa, skal vera sem minnst. Í prófuninni skal styrkur lífræns kolefnis í prófunarlátinu ekki fara meira yfir styrk lífræns kolefnis, sem er sprottið af prófunarefninu og uppleysandi efni, ef slíkt er notað, en sem nemur 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3. Prófunarlausnir

Stofnlausn prófunarefnisins er tilreidd í hæfilegum styrk. Einfaldast er að tilreiða stofnlausnina með því að blanda eða hrista prófunarefnið saman við þynningarvatnið. Ekki er mælt með notkun leysiefna eða dreifiefna (uppleysandi efna). Það kann þó í tilteknum tilvikum að vera nauðsynlegt til að fá stofnlausn með hæfilegum styrkleika. Leyfileg leysiefni eru etanól, metanól, etýlenglýkólmonómetýletri, etýlenglýkóldímetyletri, dímetýlformamíð og tríetýlenglýkól. Leyfileg dreifiefni eru Cremophor RH40, Tween 80, 0,01% metýlsellulósi og HCO-40. Gæta skal varúðar ef notuð eru auðlifbrjótanleg 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 þörf á kerfi sem skammtar stöðugt stofnlausn með prófunarefninu og þynnir hana (t.d. mældælur, hlutfallsþynningarbúnaði og metunarkerfi) og flytur prófunarefni af tilskildum styrk 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. Rennslí stofnlausnanna og þynningarvatnsins skal athugað 48 klst. fyrir prófun og síðan a.m.k. daglega í prófuninni. Við þetta eftirlit skal mæla rennslíð í hverju prófunarhólfi og ganga úr skugga um að frávik í rennslínu 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 auðfengin, fiskurinn fáið í hæfilegri stærð og að auðvelt sé að ala hann í rannsóknarstofunni. Aðrar viðmiðanir við val á fisktegund tengjast því t.d. hvort hún hefur afþreyingar- eða viðskiptagildi og hvort hún er vistfræðilega mikilvæg, svo og hvort hún hefur svipað næmi og aðrar tegundir og hvort góð reynsla er af því að nota hana.

Í 2. viðauka eru tilgreindar tegundir sem unnt er að mæla með til nota í prófunum. 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. Meðferð fisksins

Fiskurinn er látinn aðlagast í tvær vikur hið minnsta í vatni við prófunarhitann og allan tímann er honum gefið nægilegt fóður sem er sömu tegundar og hann á að fá í prófuninni.

Að loknu 48 klst. aðlögunartímabili skal skrá dánarhlutfall og styðjast við eftirfarandi viðmiðanir:

- dánarhlutfall stærra en 10% af öllum stofninum á sjö dögum: hafna skal þessum hóp,
- dánarhlutfall milli 5 og 10% af öllum fiskinum á sjö dögum: aðlögun skal standa sjö daga í viðbót,
- dánarhlutfall er minna en 5% af öllum fiskinum á sjö dögum: nota skal hópinn – ef dánartíðnin er hærrí en 5% að liðnum öðrum sjö dögum skal ekki nota þennan hóp.

Gengið skal úr skugga um að fiskur, sem er notaður í prófununum, sé sjáanlega laus við sjúkdóma og afbrigðileika. Fjarlægja skal allan sjúkan fisk. Fiskur má ekki hafa hlotið meðhöndlun gegn sjúkdómi í tvær vikur fyrir prófunina og ekki heldur fá slíka meðhöndlun 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 útskilnaðarfasanna.

1.8.2. Skilyrði meðan fiskurinn er í snertingu við prófunarefnið

1.8.2.1. Lengd upptökufasa

Spá má fyrir um lengd upptökufasans út frá fenginni reynslu (t.d. úr fyrri rannsókn eða út frá öðru efni sem safnast fyrir á svipaðan hátt) eða frá tilteknum tengslum, fundnum með athugunum og byggðum á reynslu um leysni efnisins í vatni eða deilistuðli prófunarefnisins fyrir oktanól/vatn (sjá 3. viðauka).

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 útskilnaðarfasa

Tími, sem samsvarar hálfri lengd upptökufasans, nægir venjulega til að draga nægilega úr magni (t.d. 95%) prófunarefnisins í líkama fisksins (sjá leiðbeiningar um matið í 3. viðauka). Ef sá tími, sem líður þar til magnið hefur minnkað um 95%, er allt of 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 útskilnað en kemur fram í einhólfa fisklíkani með hraðafærði af fyrstu gráðu skal hins vegar lengja útskilnaðarfasann til að ákvarða hraðafastana. Lengd tímabilsins getur hins vegar ráðist af lengd þess tímabils þar sem styrkur prófunarefnisins í fiskinum er yfir greiningarmörkunum.

1.8.2.3. Fjöldi fiska í prófun

Fyrir hvern prófunarstyrk eru valdir svo margir fiskar að fyrir hverja prófun séu tiltækir minnst fjórir fiskar við hverja sýnatöku. Ef krafist er meiri tölfræðilegrar nákvæmni 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 sýna fram á, áður en upptökutilraunin hefst, að munurinn á fituhlutfalli kynjanna sé ekki marktækur og skjalfesta þá niðurstöðu. Nauðsynlegt getur verið að meðhöndla allar hrygnur sér og alla hænga sér.

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 upprunnir á sama stað. Þar eð þyngd og aldur fisks virðist í sumum tilvikum ráða miklu um gildi lífþéttistudulsins (1. heimild) skal skrá upplýsingar þar að lútandi nákvæmlega. Æskilegt er að undirsýni fisksins séu vigtuð fyrir prófunina til að fá hugmynd um meðalþyngdina.

1.8.2.4. Þéttleiki fisksins

Nota skal mikið vatn í hlutfalli við fisk til að draga sem mest úr lækkun á C_w sem verður þegar fiskur er í upphafi tilraunar látinn í vatnið og einnig til að forðast að styrkur uppleysts súrefnis minnki. Mikilvægt er að þéttleikinn hæfi þeirri fisktegund sem er notuð í prófuninni. Í öllum tilvikum er mælt með því að þéttleikinn sé að jafnaði 0,1 til 1,0 g fisks (blautvigt) fyrir hvern lítra vatns á dag. Þéttleikinn má vera mikill ef sýnt er fram á að unnt sé að halda æskilegum styrkleika prófunarefnisins innan $\pm 20\%$ marka og að styrkur uppleysts súrefnis fari ekki undir 60% mettun.

Við val á hæfilegum þéttleika skal taka tillit til eðlilegs búsvæðis viðkomandi fisktegundar. Þannig getur til dæmis botnfiskur þurft stærra botnsvæði í fiskabúrinu, miðað við tiltekið vatnsmagn, en sá fiskur sem heldur sig að jafnaði ofar í vatninu.

1.8.2.5. Fóðrun

Á aðlögunar- og prófunartímabilinu er fiskurinn fóðraður á heppilegu fóðri með þekktu fitu- og prótíninnihaldi og í þeim mæli að hann haldist heilbrigður og haldi líkamsþyngd sinni. Fiskurinn er fóðraður daglega á aðlögunar- og prófunartímabilinu og fóðurskammturinn skal vera 1–2% af líkamsþyngdinni á dag. Þannig helst fituhlutfall flestra fisktegunda tiltölulega stöðugt í prófuninni. Magn fóðurs skal endurreiknað t.d. vikulega til að halda líkamsþyngdinni og fituhlutfallinu stöðugu. Við þessa útreikninga má áætla þyngd fisksins í hverju prófunarhólfi út frá þyngd fiska í nýjustu sýnunum úr sama hólfi. 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 í prófuninni 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 fiskmjöli 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

Ljósloftan er að öllu jöfnu 12 til 16 klst. og hitastigið (± 2 °C) skal henta viðkomandi prófunartegund (sjá 2. viðauka). Tegund og einkenni lýsingar skulu vera þekkt. Taka skal tillit til þess að prófunarefnið getur orðið fyrir ljósummyndun við þá lýsingu sem er notuð í rannsókninni. Nota skal heppilega lýsingu til að varna því að fiskurinn verði fyrir váhrifum af völdum 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. Prófunarstyrkur

Í gegnumstreymistilrauninni er fiskurinn látinn vera í snertingu við prófunarefnið í vatninu í a.m.k. tvenns konar styrk. Meiri (mesti) styrkur prófunarefnisins skal að jafnaði valinn þannig að hann sé um 1% af aðfellda miðgildisbanastyrknum LC_{50} og a.m.k. tífalt meiri en greiningarmörkin fyrir prófunarefnið í vatni með þeirri greiningaraðferð sem er notuð.

Einnig má ákvarða mesta prófunarstyrk með því að deila í 96 klst. miðgildisbanastyrkinn LC_{50} með viðeigandi hlutfalli bráðra/langvinnra eiturrifa (þessi hlutföll geta verið frá þremur og upp í 100 fyrir sum iðefni). Ef mögulegt er skal velja annan eða aðra styrkleika þannig að munur milli þeirra sé meiri en tífaldur. Ef þetta er ógerlegt vegna viðmiðunarinnar sem varðar 1% af LC_{50} og vegna greiningarmarkanna má nota lægri stuðul 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 prófunarílátum. Hlutdeild þess og prófunarefnisins í heildarinnihaldi lifræns kolefnis í prófunarvatninu skal vera þekkt. Í lengstu lög skal þó forðast notkun slíkra efna.

1.8.2.8. Samanburðarprófanir

Framkvæma skal, auk prófananna sjálfra, eina samanburðarprófun með þynningarvatni eða, ef það á við, eina samanburðarprófun 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 lifræns kolefnis, sýrustig og hita í öllum ílátum. Mæla skal heildarhórku og seltu, ef við á, í samanburðarprófunum og í einu íláti þar sem styrkurinn er meiri (mestur). Uppleyst súrefni og selta, ef við á, skulu mæld að lágmarki þrisvar sinnum – í upphafi, í miðri prófuninni og undir lok upptökutímabilsins – og vikulega á útskilnaðartímabilinu. Heildarmagn lifræns kolefnis skal mælt í upphafi prófunar (24 og 48 klst. áður en upptökufasi prófunarinnar hefst) áður en fiskurinn er settur út í og að a.m.k. vikulega, bæði í upptöku- og útskilnaðarfasa. Hiti skal mældur daglega, sýrustig í upphafi og undir lok hvers tímabils og harka einu sinni í hverri prófun. Æskilegt er að vakta hitann stöðugt í a.m.k. einu íláti.

1.8.4. *Sýnataka og greining fisks og vatns*

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 útskilnaðarfasa. Vatnssýni eru a.m.k. tekin um leið og sýni af fiskinum og áður en föðrun fer fram. Styrkur prófunarefnisins er ákvarðaður í upptökufasanum til að kanna hvort styrkleikinn sé í samræmi við gildisviðmiðanirnar.

Sýni af fiski eru tekin a.m.k. fimm sinnum í upptökufasanum og a.m.k. fjórum sinnum í útskilnaðarfasanum. Í sumum tilvikum verður erfitt að meta nákvæmlega gildi lífþéttnistuðulsins út frá þessum fjölda sýna, einkum ef vísbendingar eru um að hraðafræði útskilnaðar sé ekki af fyrstu gráðu, og því getur verið skynsamlegt að taka sýni oftár í báðum fösnum (sjá 4. viðauka). Viðbótarsýnin skulu geymd og því aðeins efnagreind að niðurstöður fyrstu umferðarinnar í greiningum reynist ekki nægja til að unnt sé að reikna lífþéttnistuðulinn með æskilegri nákvæmni.

Dæmi um viðunandi sýnatökuáætlun er gefið í 4. viðauka. Auðvelt er að setja upp aðrar áætlanir út frá reikningum á upptökutímabili fyrir 95% upptöku með því að nota önnur gefin gildi fyrir P_{ow} .

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 útskilnaðarfásinn hefst.

1.8.4.2. Sýnataka og tilreiðsla sýna

Vatnssýni til greiningar eru tekin t.d. með því að sjúga vatnið með hvarftregri slöngu úr miðju prófunarhólfins. Þar eð hvorki síun eða né skiljun í skilvindu virðast skilja að þann hluta prófunarefnisins, sem er ekki lífaðgengilegur, frá þeim sem er lífaðgengilegur (á einkum við um mjög fitusækin efni, þ.e. efni sem hafa $\log P_{ow} > 5$) (1. og 5. heimild), skulu sýni ekki meðhöndluð með þeim hætti.

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 útskilnaðarfasanum.

Hæfilegur fjöldi fiska (að jafnaði ekki færri en fjórir) eru teknir úr prófunarhólfinu við hverja sýnatöku. Fiskar, sem lenda í úrtaki, eru skolaðir snögg með vatni, þerraðir og aflífaðir strax á mannúðlegan hátt og með 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 forðast skekkju af völdum niðurbrots eða annars konar taps og til að reikna nokkurn veginn gildin fyrir upptöku- og útskilnaðarhraðann eftir því sem prófuninni miðar. Ef efnagreiningar eru gerðar þegar í stað er einnig unnt að uppgötva strax þegar sléttu er náð.

Ef efnagreiningar eru ekki gerðar strax skulu sýni geymd með viðunandi hætti. Áður en rannsóknin hefst skal afla upplýsinga um réttu geymsluaðferðina fyrir einstök prófunarefni – t.d. djúpfrystingu, geymslu við 4 °C, geymslutíma, útdrátt o.s.frv.

1.8.4.3. Gæði efnagreiningaraðferðar

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 bæði úr vatninu og fiskinum, séu fullnægjandi að því er varðar viðkomandi aðferð. Einnig skal ganga úr skugga um að prófunarefnið greinist ekki í þynningarvatninu sem er notað.

Ef þörf krefur skulu gildin fyrir C_w og C_f , sem fást í prófuninni, leiðrétt með tilliti til endurheimtar og bakgrunnsgilda samanburðarhópanna. Fisk- og vatnssýni skulu ávallt meðhöndluð þannig að mengun og tap verði í lágmarki (t.d. vegna ásogs sýnatökubúnaðarins).

1.8.4.4. Greining fiskisýna

Ef geislamerkt efni eru notuð í prófuninni getur greiningin miðast við allt geislamerkta efnið (þ.e. móðurefnið og umbrotsefni þess) en einnig má hreinsa sýnin þannig að móðurefnið verði greint sérstaklega. Greina má eiginleika helstu umbrotsefna við stöðugt ástand, en þó ekki síðar en í lok upptökufasans. Ef lífþéttnistuðullinn, mældur sem geislamerktar heildarleifar, er $\geq 1000\%$ getur verið ráðlegt, og fyrir efni í tilteknum flokkum, t.d. flokki varnarefna, er eindregið mælt með því, að sanngreina og ákvarða magn niðurbrotsefna sem eru $\geq 10\%$ af heildarleifum í fiskvefjum við stöðugt ástand. Ef niðurbrotsefni, sem eru $\geq 10\%$ 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 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 víska skipta miklu máli skal prófunin (6. heimild og 7. heimild) ná til nægilega margra fiska þannig að hún samrýmist þeirri hópunaraðferð og þeirri tölfræðilegu vísu sem sóst er eftir.

Lífþéttmistuðullinn skal gefinn bæði sem fall af heildarblautvigti og sem fall af fituinnihaldi ef um er að ræða mjög fitusækin efni. Fituinnihald fisks er ákvarðað í hverri sýnatöku ef unnt er að koma því við. Nota skal viðeigandi aðferðir til að ákvarða fituinnihaldið (8. og 2. heimild í 3. viðauka). 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 ætti fitumæling að fara fram á sama útdrætti og er notaður í greiningunni á prófunarefninu því að oft þarf að fjarlægja fituefni úr útdrættinum áður en hægt er að greina prófunarefnið með litskiljun. Munurinn á fituinnihaldi fisksins (mælt sem mg/kg blautvigtar) í lok tilraunarinnar, miðað við innihaldið í upphafi tilraunarinnar, má ekki vera meiri en $\pm 25\%$. Hlutdeild þurrefnis í vefnum skal einnig gefin þannig að umreikna megi styrk fituefna frá blautvigti yfir í gildi fyrir þurrefni.

2. GÖGN

2.1. Úrvinnsla niðurstaðna

Upptökuferill prófunarefnisins er fenginn með því að teikna styrk þess í eða á fiskinum (eða tilteknum vefjum) í upptökufasanum á móti tímanum á línulegum kvarða. Ef ferillinn hefur náð sléttu, þ.e. er nánast samsíða tímaásnum, er stöðugt ástand BCF_{SS} reiknað út frá:

$$\frac{C_f \text{ við stöðugt ástand (meðaltal)}}{C_w \text{ við stöðugt ástand (meðaltal)}}$$

Ef stöðugt ástand næst ekki má reikna BCF_{SS} með nægilegri nákvæmni til nota við hættumat út frá „stöðugu ástandi“ við 80% ($1,6/k_2$) eða 95% ($3,0/k_2$) jafnvægi.

Lífþéttistuðullinn (BCF_k) er einnig ákvarðaður sem hlutfallið k_1/k_2 milli fastanna tveggja við hraðafraði af fyrstu gráðu. Fastinn fyrir útskilnaðarhraða (k_2) er að jafnaði ákvarðaður út frá útskilnaðarferlinum (þ.e. þar sem fall í styrk prófunarefnisins í fiskinum er sett á móti tíma). Fastinn fyrir upptökuhraðann (k_1) er síðan reiknaður að gefnum fastanum k_2 og gildinu á C_f sem er fundið úr upptökuferlinum (sjá einnig 5. viðauka). Besta aðferðin við að reikna BCF_k og hraðafastana, k_1 og k_2 , er að reikna færíbreyturnar með ólínulegum matsaðferðum í tölvu (11. heimild). Að öðrum kosti má reikna k_1 og k_2 með myndrænum aðferðum. Ef augljóst er að útskilnaðarferillinn er ekki af fyrstu gráðu skal beita flóknari líkönum (sjá heimildir í 3. viðauka) og leita ráða hjá sérfræðingi í líftölfræði.

2.2. Túlkun niðurstaðna

Niðurstöðurnar skulu túlkaðar með varúð ef mældur styrkur prófunarlausna er nálægt greiningarmörkum efnagreiningaraðferðarinnar.

Vel skilgreindir ferlar fyrir upptöku og útskilnað eru vísbending um að gögnin fyrir lífþéttina séu traust. Breytileiki í upptöku- eða útskilnaðarföstum við tvo mismunandi styrkleika prófunarefnis skal vera minni en 20%. Ef fram kemur marktækur munur á upptöku- og útskilnaðarhraða við þá tvo styrkleika sem eru notaðir í prófuninni skal skrá hann og reyna að skýra hann. Að jafnaði eru öryggismörk fyrir gildi lífþéttistuðulsins í vel hönnuðum rannsóknum í kringum $\pm 20\%$.

3. SKÝRSLUGJÖF

Eftirtaldir upplýsingar skulu vera í prófunarskýrslunni:

3.1. Prófunarefni

- eðliseiginleikar og, þar sem við á, eðlisefnafræðilegir eiginleikar,
- efnafræðileg gögn um sanngreiningu (þ.á m. innihald lífræns kolefnis ef við á),
- ef efnið er geislamerkt skal tilgreina nákvæma stöðu merktu frumeindarinnar eða frumeindanna og hve stór hundraðshluti geislavirkinnar tengist óhreinindum.

3.2. Prófunartegund

- vísindaheiti, stofn, uppruni, hvers kyns formeðhöndlun, aðlögun, aldur, stærðarflokkur o.s.frv.

3.3. Prófunarskilyrði

- prófunaraðferð (t.d. gegnumstreymis- eða hálfkyrrstöðuþrófun),
- tegund og einkenni þeirrar lýsingar sem er notuð og ljóslota eða ljóslotur,
- hönnun tilraunar (t.d. fjöldi og stærð prófunarhólfa, hve hratt er skipt um vatn, fjöldi endurtekninga, fjöldi fiska í hverri endurtekningu, fjöldi prófunarstyrkleika, lengd upptöku- og útskilnaðarfasanna 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 prófunarílátunum og sú aðferð sem er notuð til að reikna þessi gildi,
- uppruni þynningarvatns, lýsing á hvers kyns formedhöndlun, niðurstöður úr tilraunum sem eru gerðar til að sýna fram á hæfni prófunarfisksins til að þrífast í vatninu og eiginleikar vatnsins: pH, harka, hiti, styrkur uppleysts súrefnis, magn klórleifa (ef það er mælt), heildarmagn lífræns kolefnis, svifagnir, selta í prófunarmiðlinum (ef við á) og hvers kyns aðrar mælingar sem eru gerðar,
- gæði vatns í prófunarílátum, pH, harka, heildarmagn lífræns kolefnis, hiti og styrkur uppleysts súrefnis,
- nákvæmar upplýsingar um fôðrun (t.d. tegund fôðurs, uppruni, samsetning, a.m.k. að því er varðar fitu- og prótínnihald ef unnt er, hve mikið og hve oft gefið),
- upplýsingar um meðhöndlun fisk- og vatnssýna, þ.á m. nákvæmar upplýsingar um tilreiðslu, geymslu, útdráttar- og efnagreiningaraðferðir (og samkvæmni) að því er varðar prófunarefnið og fituinnihaldið (ef það er mælt).

3.4. Niðurstöður

- niðurstöður úr hvers kyns forrannsóknnum sem eru gerðar,
- dánarhlutfall fisks í samanburðarhópi og fisks í hverju prófunarhólfi, svo og hvers kyns atferli sem þykir óeðlilegt,
- fituinnihald fisksins (ef það er ákvarðað í tengslum við prófunina),
- ferlar (þ.á m. öll mæligögn), sem sýna upptöku og útskilnað prófunarefnis í fiskinum, og tími þar til stöðugt ástand kemst á,
- C_f og C_w (ásamt staðalfrávikum og bili ef við á), fyrir öll tekin sýni (C_f gefið upp í $\mu\text{g/g}$ blautvigtar (milljónarhlutum), í fiskinum eða tilteknum vefjum hans, t.d. fituvef, og C_w í $\mu\text{g/ml}$ (milljónarhlutum). C_w -gildi fyrir samanburðarhópinn (bakgrunnsgildi skulu einnig tilgreind),
- lífþéttistuðullinn við stöðugt ástand (BCF_{SS}) og/eða hraðafræðilegur þéttistuðull (BCF_k) og, ef slíkt á við, 95% öryggismörk að því er varðar fasta fyrir upptöku- og útskilnaðarhraða (tap) (allt gefið upp í hlutfalli við líkamsþyngd fiskanna og heildarfituinnihald fiskanna, ef það er mælt, eða tiltekinn vefja þeirra), öryggismörk og staðalfrávik (liggi þau fyrir) og aðferðir við stærðfræðilega úrvinnslu gagnanna fyrir alla styrkleika prófunarefnisins,
- ef geislamerkt efni eru notuð skal tilgreina hugsanlega uppsöfnun allra umbrotsefna sem greinast ef þess er þörf,
- hvaðeina sem telst óvenjulegt í prófuninni, hvers kyns frávik frá aðferðunum og hvers kyns aðrar upplýsingar sem skipta máli.

Halda skal í lágmarki niðurstöðum á borð við „kemur ekki fram við greiningarmörk“ með því að þróa aðferðir í undanfara prófananna og bæta tilraunahönnunina 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. og Karcher W. (1993). *Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient*. SAR og QSAR í 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. Nr. 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. Júlí, 1994.
 - 6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. *Pesticide analytical manual*, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, júlí 1975.
 - 7) US EPA (1974). 5. liður, A(1). *Analysis of Human or animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ritstj.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
 - 8) Compaan H. (1980) í „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“, k. 2.3, II. hluti. Government Publishing Office, the Hague, Netherlands.
 - 9) Gardner et al (1995). *Limn. & Oceanogr.* 30, bls. 1099–1105.
 - 10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. og 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*. Lokaskýrsla, mars 1987. Höfundar: P. Kristensen og N. Nyholm.
 - 12) ASTM E-1022-84 (samþykkt á ný 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.
-

1. viðauki

Viðunandi efnaeiginleikar þynningarvatns

	Efni	Styrkmörk
1	Agnir	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	Heildarmagn klórlífrænna varnarefna ásamt fjöklóruðum bífenýlum	50 ng/l
7	Heildarmagn lífræns klórs	25 ng/l
8	Ál	1 µg/l
9	Arsen	1 µg/l
10	Króm	1 µg/l
11	Kóbalt	1 µg/l
12	Kopar	1 µg/l
13	Járn	1 µg/l
14	Blý	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Sink	1 µg/l
17	Kadmíum	100 ng/l
18	Kvikasilfur	100 ng/l
19	Silfur	100 ng/l

2. viðauki

Fisktegundir sem eru heppilegar til prófunar

	Heppilegar prófunartegundir	Æskilegt hitasvið í prófuninni (°C)	Æskileg heildarlengd prófunarfisks (cm)
1	<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan), sebradanni	20–25	3,0 ± 0,5
2	<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), kringlukarpi	20–25	5,0 ± 2,0
3	<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus), vatnakarpi	20–25	5,0 ± 3,0
4	<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck og Schlegel), japansrísfiskur	20–25	4,0 ± 1,0
5	<i>Pocilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), gúbbi	20–25	3,0 ± 1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque), röðulborri	20–25	5,0 ± 2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), regnbogasilungur	13–17	8,0 ± 4,0
8	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus), hornsili	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.:

Trumbufiskur	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Kjammkarpi	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Gljáæringi	<i>Menidia beryllina</i>
Skinkarpi	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Englakoli	<i>Parophrys vetulus</i>
Brynhnútur	<i>Leptocottus armatus</i>
Hornsili	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Vartari	<i>Dicentracus labrax</i>
Hreisturglæsir	<i>Alburnus alburnus</i>

Útvegum fiska

Ferskvatnsfiskarnir, sem eru taldir upp í töflunni, eru auðaldir 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 þá, annaðhvort í fiskeldisstöðvum eða á rannsóknarstofum, undir eftirliti að því er varðar sjúkdóma og sníkjudýr sem tryggir að prófunarfiskurinn verður heilbrigður og uppruni hans er þekktur. Þessir fiskar fást víða um heim.

3. viðauki

Spáð fyrir um lengd upptöku- og útskilnaðarfasanna

1. Spáð fyrir um lengd upptökufasans

Áður en prófunin er framkvæmd er unnt að áætla, út frá rauntengslum milli k_2 og deilistuðuls fyrir oktanól/vatn (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 (dagar⁻¹), t.d. út frá eftirfarandi rauntengslum (1. heimild):

$$\log_{10}k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (1. \text{ jafna})$$

Sjá 2. heimild að því er varðar önnur tengsl.

Ef deilistuðullinn (P_{ow}) er óþekktur má byggja matið (3. heimild) á upplýsingum um vatnsleysni efnisins (s) með eftirfarandi formúlu:

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (2. \text{ jafna})$$

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 útskilnaði (hraðafærði af fyrstu gráðu).

$$\frac{dC_t}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_t$$

eða ef C_w er stöðugt:

$$C_t = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (3. \text{ jafna})$$

Þegar stöðugu ástandi er náð ($t \rightarrow \infty$) má einfalda 3. jöfnu (5. og 6. heimild) í:

$$C_t = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{eða} \quad C_t/C_w = k_1/k_2 = BCF$$

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:

$$C_t = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{eða} \quad \frac{C_t}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (4. \text{ jafna})$$

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 kjör lengd upptökufasans, til þess að tölfræðilega, viðunandi gögn (BCF_k) fáiast, sé sá tími, sem líður þar til ferillinn fyrir lygrann 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):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{eða} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (5. \text{ jafna})$$

Á sama hátt fæst 95% af stöðugu ástandi með:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (6. \text{ jafna})$$

Lengd upptökufasans (uf) fyrir prófunarefni með $\log P_{ow} = 4$ yrði t.d. (1., 5. og 6. jafna):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ dagar}^{-1} \\ \text{uf (80\%)} &= 1,6/0,652, \text{ þ.e. } 2,45 \text{ dagar (59 klst.)} \\ \text{eða uf (95\%)} &= 3,0/0,652, \text{ þ.e. } 4,60 \text{ dagar (110 klst.)} \end{aligned}$$

Fyrir prófunarefni með $s = 10^{-5}$ mól/l ($\log(s) = 5,0$) yrði lengd uf á sama hátt (1., 2., 5. og 6. jafna):

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} k_2 &= -0,414 (5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ dagar}^{-1} \\ \text{uf (80\%)} &= 1,6/0,246, \text{ þ.e. } 6,5 \text{ dagar (156 klst.)} \\ \text{eða uf (95\%)} &= 3,0/0,246, \text{ þ.e. } 12,2 \text{ dagar (293 klst.)} \end{aligned}$$

Að öðrum kosti má nota jöfnuna:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (klst.)}$$

til að reikna þann tíma sem liður þar til raunverulegt, stöðugt ástand er komið á (4. heimild).

2. Spáð fyrir um lengd útskilnaðarfásans

Út frá almennu jöfnunni sem lýsir upptöku og útskilnaði (hraðafærði af fyrstu gráðu) (1. heimild) (8. heimild) má einnig spá fyrir um þann tíma sem liður þar til styrkur efnisins í líkamanum hefur minnkað niður í tiltekinn hluta af upphaflega styrknum.

Í útskilnaðarfasanum telst C_w vera núll. Jöfnuna má einfalda þannig að hún verði:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{eða} \quad C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

þar sem $C_{f,0}$ er styrkurinn í upphafi útskilnaðartímabilsins. Á tímapunktinum t_{50} hefur þá náðst 50% útskilnaður:

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{eða} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Á sama hátt hefur þá náðst 95% útskilnaður við:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ef miðað er við 80% upptöku á fyrsta tímabilinu ($1,6/k_2$) og 95% tapi í útskilnaðarfasanum ($3,0/k_2$) verður útskilnaðarfásinn um það bil tvöfalt lengri en upptökufásinn.

Mikilvægt er þó að hafa í huga að matsferlin byggjast á þeirri forsendu að upptaka og útskilnaður fylgi hraðafærði af fyrstu gráðu. Ef augljóst er að hraðafærðin er ekki af fyrstu gráðu skal nota flóknari líkön (t.d. 1. heimild).

Heimildir (fyrir 3. viðauka):

- 1) Spacie A. og 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 BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals*. Danish Water Quality Institute.
 - 3) Chiou C.T. og Schmedding D.W. (1982). *Partitioning of organic compounds in octanol-water systems*. Environ. Sci. Technol. 16 (1), bls. 4–10.
 - 4) Hawker D.W. og 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. og Neely W.B. (1975). *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), bls. 785–792.
 - 6) Ernst W. (1985). Accumulation in Aquatic organisms. *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Sheehman P., Korte F., Klein W. og Bourdeau P.H. (ritstj.). Hluti 4.4, bls. 243–255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
 - 7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. og 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. og Van Leeuwen K. (1980). *Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, bls. 3–19.
-

4. viðauki

Fræðilegt dæmi um sýnatökuáætlun fyrir lífféttniþrófanir á efnun með
 $\log P_{ow} = 4$

Fisksýnataka	Tímaáætlun fyrir sýnatöku		Fjöldi vatnssýna	Fjöldi fiska í sýni
	Áskilin lágmarkstíðni (dagar)	Viðbótarsýni		
Uppþökufasi	- 1 0		2 (*) 2	Setjið 45 til 80 fiska út í vatnið
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
Útskilnaðar- fasi				Flytjið fiskinn í vatn sem er án prófunarefna
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)

(*) Taka skal sýni af vatninu þegar vatn, sem nemur minnst þreföldu rúmmáli prófunarhólfisins, hefur farið gegnum hólfíð.

Tölur í svigunum eru fjöldi sýna (vatns eða fisks) sem taka skal ef viðbótarsýni eru tekin.

Ath.: Fyrir prófunina er k_2 fyrir $\log P_{ow}$ með gildið 4,0 áætlað $0,652 \text{ dagar}^{-1}$. Heildarlengd rannsóknanna er ákveðin

$3 \times uf = 3 \times 4,6$ dagar, þ.e. 14 dagar. Í 3. viðauka er að finna upplýsingar um matið á „uf“.

5. viðauki

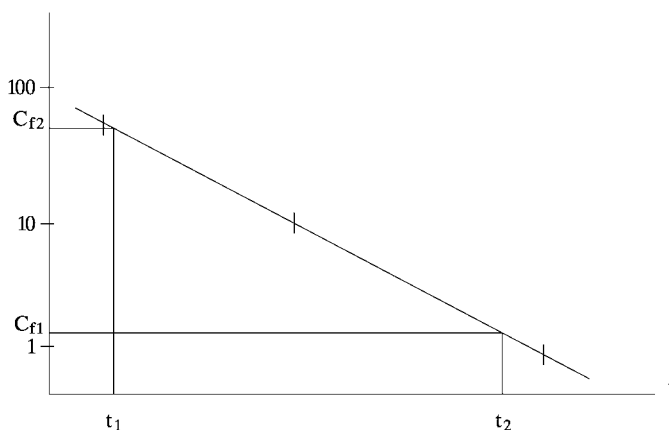
Lýsing á líkani

Flestum lífþéttngögnum hefur mátt lýsa „tiltölulega“ vel með einföldu tveggja hólfa líkani með tveimur færíbreytum sem finna má út frá beina ferlinum sem dreginn er gegnum punktana fyrir styrkinn í fiskinum í útskilnaðarfasanum þegar ferillinn er dreginn á hálflygrapappír. (Ef ekki er hægt að lýsa þessum punktum með beinum ferli skal nota flóknari líkón, sjá t.d. Spacie og Hamelink, 1. heimild í 3. viðauka).

Myndræn aðferð til að ákvarða fastann k_2 fyrir útskilnaðarhraða

Setja skal á hálflygrapappír styrk prófunarefnisins í hverju fiskisýni á móti sýnatökutímanum. Halli þeirrar línu er k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1} / C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Athygli er vakin á því að frávik frá beinni línu getur verið vísbending um að útskilnaðurinn sé flóknari en svo að hraðafærði hans sé af fyrstu gráðu. Nota má myndræna aðferð til að greina þær tegundir útskilnaðar sem víkja frá fyrstu gráðu hraðafærði.

Myndræn aðferð til að ákvarða hraðafastann k_1 fyrir upptöku

Að gefnu gildinu fyrir k_2 skal reikna k_1 á eftirfarandi hátt:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (1. \text{ jafna})$$

Gildi C_f er lesið af við miðpunktinn á slétta upptökuferlinum sem fæst út frá gögnunum þegar lygrinn af styrknum er settur á móti tíma (á línulegum kvarða).

Aðferð til að reikna hraðafastana fyrir upptöku og útskilnað í tölvu

Besta aðferðin við að reikna lífþéttnistuðulinn og hraðafastana k_1 og k_2 er að reikna færribreyturnar með ólínulegum matsaðferðum í tölvu. Slík forrit reikna gildin á k_1 og k_2 út frá safni gagna um styrk í tímaröð og eftirfarandi jöfnum:

$$C_t = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (2. \text{ jafna})$$

$$C_t = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (3. \text{ jafna})$$

þar sem t_c = tíminn í lok upptökufasans.

Með þessari nálgun má áætla staðalfráviknið fyrir k_1 og k_2 .

Sökum þess að í flestum tilvikum er unnt að áætla k_2 með talsverðri nákvæmni út frá útskilnaðarferlinum og vegna þess að sterk fylgni er milli færribreytnanna k_1 og k_2 ef þær eru áætlaðar samtímis er skynsamlegt að reikna fyrst k_2 út frá útskilnaðargögnunum einum og reikna síðan k_1 út frá upptökugögnunum með ólínulegri aðhvarfsgreiningu.