

Bilgi Gereklilikleri ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesi Rehberi

**Bölüm R7a Sonlanma noktası özel rehberi için geçerli nanomalzemeler
için uygulanabilir Ek R7-1**

Ekim 2020

YASAL UYARI

Bu belge, kullanıcılara Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi İzni ve Kısıtlanması Hakkında Yönetmelik uyarınca yükümlülüklerini yerine getirmelerine yardımcı olma amaçlı bir dizi rehber belgeden biridir. Bununla beraber, söz konusu Yönetmeliğin tek gerçek referans olduğu ve işbu belgede yer verilen bilgilerin yasal tavsiye niteliğinde olmadığı hatırlatılır. Bilgilerin kullanımı tamamen kullanıcının sorumluluğundadır. Çevre ve Şehircilik Bakanlığı işbu belgenin içindeki bilgilerin kullanımından açığa çıkabilecek hiçbir yükümlülük kabul etmemektedir.

Bu rehber, Avrupa Kimyasallar Ajansı (European Chemicals Agency-ECHA) tarafından REACH Tüzüğü'nün uygulanmasına ilişkin hazırlanan "Appendix R7-1 for nanomaterials applicable to Chapter R7a Endpoint specific guidance" adlı rehberden Türkçe'ye çevrilmiş ve Türkiye'deki mevzuata göre uyarlanmıştır. Rehberin İngilizce orijinal metnine ECHA'nın web sitesinden erişilebilir (<https://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-reach>)

Bilgi Gereklilikleri ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesi Rehberi

Bölüm R7a - Sonlanma noktası özel rehberi'nde geçerli nanomalzemeler için Ek R7-1

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı

BS ISO 9276-6: 2008'den alıntılarının çoğaltma izni BSI tarafından verilmektedir. Bu alıntılarının başka hiçbir şekilde kullanımına izin verilmez. İngiliz Standartları, BSI çevrimiçi mağazasından (www.bsigroup.com/Shop) PDF veya basılı kopya biçiminde edinilebilir veya yalnızca basılı kopyalar için BSI Müşteri Hizmetleri ile iletişime geçilebilir: Tel: +44 (0) 20 8996 9001, E-posta: cservices@bsigroup.com.

Bu Rehber dokümana ilişkin sorularınız ya da yorumlarınız varsa (yorumlarınızın olduğu dokümanın referans numarasını, yayınlanma tarihini, bölüm ve/veya sayfa numarasını belirterek), Kimyasallar Yardım Masasındaki soru formunu kullanarak gönderebilirsiniz. Geri bildirim formuna Çevre ve Şehircilik Bakanlığı Kimyasallar Yardım Masasında aşağıdaki linki kullanarak doğrudan ulaşabilirsiniz: <https://kimyasallar.csb.gov.tr>

Çevre ve Şehircilik Bakanlığı

Adres: Mustafa Kemal Mahallesi Eskişehir Devlet Yolu
(Dumlupınar Bulvarı) 9. km. No: 278 Çankaya / Ankara

ÖNSÖZ

Kayıt ettirenlere, "nanoformları" kapsayan KKDİK kayıt dosyalarını hazırlarken kullanılmak üzere tavsiye sağlamak için bilgi gerekliliklerine ilişkin üç ek (BG ve KGD Rehberi Bölümleri R7a, R7b ve R7c ekleri) geliştirilmiştir¹.

Bu belgede verilen tavsiyeler, nanomalzemelerin test edilmesine yönelik özel önerilere odaklanmaktadır². Sağlanan tavsiyenin bir kısmı tamamen nanomalzemelere özgü değildir ve diğer tanecikli malzemeler (yani, çözünme hızı ile ilgili) için de geçerli olabilir. Bununla birlikte, bu tür bir tavsiye dahil edildiğinde, kapsanan konunun özellikle nanomalzemeler ile ilgili olduğu ve nanomalzemelere özgü rehberin bir parçası olması gerektiği düşünülmelidir.

Herhangi bir uygun özel hükmün yokluğunda (halihazırda sağlanan rehberin nanomalzemeler için eşit derecede geçerli olduğu düşünüldüğünde sonlanma noktasının nanomalzemeler için ilgili olmaması ya da tavsiyenin geliştirilmesinden önce daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulması sebebiyle) bu eke sonlanma noktası için ilave bir rehber dahil edilmemiştir.

Bu ek, nanomalzemelere özgü tavsiyeler sağlamayı amaçlamaktadır ve Bölüm R.7a'da verilen genel ilkelerin (yani ana rehber) uygulanabilirliğini engellemez.

Ayrıca, bu ekte belirli bir sonlanma noktası için herhangi bir tavsiye verilmemişse ana Rehber'de verilen tavsiyelere uyulmalıdır.

Lütfen bu belgenin (ve ana rehberin) KKDİK Yönetmeliği Ek 6 - Ek 11'de belirtilen bilgi gerekliliklerinin karşılanması konusunda özel rehberlik sağladığını unutmayınız.

Mevcut bilgilerin toplanması ve değerlendirilmesi ile bilgi gerekliliklerinin uyarlanması gibi bilgi gerekliliklerini karşılamaya yönelik genel bilgiler, BG & KGD Rehberi, Bölüm R.2 ila R.5'te mevcuttur.

Ayrıca, mevcut olan verilerin kullanımı dikkate alındığında *Ek R.6-1: Nicel Yapı-Aktivite İlişkileri ve Kimyasalların Gruplandırılmasına İlişkin Rehber'de* [1] geçerli olan *nanomalzemeler*, aynı maddenin nanoformları (ve nanoformu olmayan maddeler) arasındaki zararlılık verilerinin kullanımının nasıl gerekçelendirileceğine dair bir yaklaşım sağlaması sebebiyle yararlı olabilir.

¹ Lütfen nanoformları kapsayan kayıt dosyalarının nasıl hazırlanacağına bakınız: en iyi uygulamalar [153]

² Avrupa Komisyonu tarafından benimsenen [Nanomalzeme tanımına ilişkin tavsiye](#)'ye bakınız.

İçindekiler

2	FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLER İÇİN ÖNERİLER.....	7
2.1	Genel açıklamalar.....	7
2.1.1	Numune hazırlama	7
2.2	Sonlanma noktaları için özel tavsiye	11
2.2.1	Suda çözünürlük	11
2.2.2	N-oktanol/su dağılım katsayısı	12
2.2.3	Granülometri	14
2.2.4	Yüzeğe tutunma/Yüzeyden sıyrılma	50
3	NANOMALZEMELER İÇİN TOKSİKOLOJİK BİLGİ GEREKLİLİKLERİ İLE İLGİLİ ÖNERİLER ...	52
3.1	Genel tavsiye notları.....	52
3.1.1	İnsan sağlığı sonlanma noktaları için test ve numune alma stratejisi ve numune hazırlama hakkında genel tavsiye notu	52
3.1.2	Tayin müdahalesinin dikkate alınmasıyla ilgili tavsiye notu	55
3.2	Bireysel sonlanma noktaları için özel tavsiye.....	57
3.2.1	Tekrarlı doz toksisitesi	57
3.2.2	Mutajenite ve kanserojenite	61
Ek 1	. Nanomalzemeler için davranış modelleri.....	64
	REFERANSLAR.....	65

Tablolar

Tablo 1:	Malzemenin tanecik boyutu dağılımını olduğu gibi belirleme yöntemleri.....	17
Tablo 2:	Havada dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikleri oluşturma/numune alma yöntemleri.....	23
Tablo 3:	Yalnızca içe çekilebilir oranları ölçen veya ayrıntılı dağılımlar vermeyen yöntemler.....	25
Tablo 4:	Havada dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikleri ölçme yöntemleri	26
Tablo 5:	Tanecik şekli ve morfolojisinin nicel veya yarı nicel tanımı için yöntemler	37
Tablo 6:	Geometrik makro şekilli tanımlayıcılar (ISO 9276-6: 2008 [62]'den alınmıştır)	40
Tablo 7:	Geometrik oranlı makro şekil tanımlayıcıları (ISO 9276-6: 2008 [62]'den alınmıştır)	41
Tablo 8:	Mezo şekilli tanımlayıcılar (ISO 9276-6: 2008 [62]'den alınmıştır).....	42
Tablo 9:	Şekil tanımlayıcılarının kombinasyonu (ISO 9276-6: 2008 [62]'den alınmıştır).....	43
Tablo 10:	Sertlik tanımlayıcısı (ISO 9276-6: 2008 [62]'den yeniden oluşturulmuştur)	43
Tablo 11:	Yüzey alanının belirlenmesi için Brunauer, Emmet ve Teller (BET) yöntemi	47
Tablo 12:	Yaygın olarak kullanılan tayinlerle potansiyel etkileşim kaynakları	56
Tablo 13:	Nanomalzemelerin davranışı için bazı modellere genel bakış	64

Şekiller

Şekil 1: Granülometri için Bütünleşik Test Stratejisi (BTS)	33
Şekil 2: Şekil açıklaması için bazı yöntemlerin sınıflandırılması (ISO 9276- 6: 2008 [62]'den uyarlanmıştır)	36
Şekil 3: Şekil için BTS	44
Şekil 4: Tanecik boyutu dağılımı, yüzey alanı ve şekli için ortak BTS	49
Şekil 5: İnsan sağlığı sonlanma noktaları için nanomalzeme testlerinde karar şeması	52
Şekil 6: Tutulan akciğer yükü ile akciğer aşırı yüklenmesi olgusuna yol açan maruz kalma süresi arasındaki ilişkinin şematik temsili A, B ve C eğrileri, giderek artan maruz kalma dozları ile ilişkilidir. Maruz kalma seviyesi yeterince yüksekse ve maruz kalma süresi yeterince uzunsa, taneciklerin alveoler makrofaj aracılı klirensi baskılanabilir. Bu meydana geldiğinde, tutulan akciğer yükü, daha fazla maruz kalma ile doğrusal olarak artar (C* eğrisi). [120]'den alınmıştır	59

2 FİZİKO-KİMYASAL ÖZELLİKLER İÇİN ÖNERİLER

2.1 Genel açıklamalar

2.1.1 Numune hazırlama

Aşağıdaki bölüm numunenin hazırlanmasına odaklanmaktadır, bu nedenle halihazırda bir test malzemesi(leri) seçiminin yapıldığı ve bunların kayıtlı maddeyi ve/veya ilgili nanoformları temsil ettikleri ifade edilmektedir.

Numune hazırlama, nanomalzemelerin başarılı karakterizasyonu ve daha sonra test edilmesine yönelik en kritik adımlardan biri olarak kabul edilmektedir. Numune hazırlama için bir yöntem tasarlarırken dikkate alınması gereken birçok değişken vardır. Numune hazırlama ile ilgili dikkate alınması gereken yaygın konular arasında test edilen nanomalzemenin depolanması, koloidal ve kimyasal kararlılığı, test ortamının kimyasal bileşimi, stok çözelti dağılımlarının karakterizasyonu ve uygulama/test öncesi (stok çözelti dağılımlarından hazırlanan) numunelerin karakterizasyonu bulunmaktadır [2] .

Nanoformlar da dahil olmak üzere bir kayıt kapsamındaki maddenin tüm olası formlarından kaynaklanan zararlılık, kayıt dosyasında sağlanan toksikolojik ve ekotoksikolojik bilgilerle ele alınmalıdır. Seçilen test malzemesinin/malzemesinin değerlendirilen maddeyi ve/veya nano(formları) temsil etmeye uygun olduğunu göstermek için, KKS'deki test malzemesi bilgileri alanı altında sonlanma noktası çalışma kaydında bazı bilgiler rapor edilmelidir. Aşağıdaki parametreler sağlanmalıdır :

- Kimyasal bileşim (KKDİK ve SEA kapsamında *maddelerin tanımlanması ve adlandırılmasına ilişkin ÇŞB Rehberi*'nde açıklandığı gibi)
- Boyut (minimum D50 olarak, ancak tanecik boyutu dağılımı önerilir)
- Şekil ve en boy oranı
- Yüzey Kimyası

Ayrıca, Nicel Yapı Aktivite İlişkileri ve Kimyasalların Gruplandırılması [1] rehberine uygulanabilen nanomalzemeler için Ek R6-1, aynı maddenin nanoformları (ve nanoform olmayan) arasındaki zararlılık verilerinin kullanımının nasıl gerekçelendirileceğine dair bir yaklaşım sağlar. Rehber, mevcut zararlılık verilerinin bir maddenin farklı nanoformları için geçerli olup olmadığını değerlendirebilmek amacıyla gerekli olabilecek bazı (ilave) parametreler sağlar. Kayıt ettiren, yukarıda bahsedilen rehberi takip edebilmek için bu tür parametreleri dikkate alarak test malzemesini karakterize etmeyi düşünebilir. Örneğin, çözünme hızı, yüzey kimyası ve dağılıbilirlik, nanomalzemelerin gruplandırılması için bir temel olarak rapor edilmiştir [1].

Tüm bu parametrelerin yanı sıra ISO 14887: 2007 [3], genel olarak maddelerin tanecik boyutu analizi için çeşitli toz/sıvı kombinasyonlarından iyi dağılımlarının hazırlanabilmesi amacıyla prosedürlerin ana hatlarını belirtir. Çeşitli nanomalzemeler için önerilen dağılım prosedürleri de bilimsel literatürde örneğin [4] ve [5]'te ortaya çıkmaktadır.

Bununla birlikte, bu tür prosedürlerin incelenen test malzemesi için yeterli olup olmadığını belirlemek amacıyla dikkatlice incelenmelidir ve farklı malzemeler için değişiklikler gerekli olabilir. Örneğin, soluma toksisitesi testi ile ilgili olarak buharlaştırma/yoğunlaşma yönteminin (ISO 10801: 2010 [5]) kullanılması sonucunda metal nanotaneciklerinin üretimi için gerekli prosedürleri özetleyen ve soluma maruz kalma odalarındaki nanotaneciklerin karakterizasyonunu destekleyen standartlar mevcuttur.

[5].

Numune hazırlamanın önemli bir bileşeni, "güvenilir" numune almaktır. Güvenilir numune almada, ölçüm için kullanılan test alikotu, tüm numunenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini temsil eder. Boyut, biçim ve özgül yüzey alanı gibi parçacık özelliklerinin karakterizasyonu, çok dikkatli numune alımını ve izlenecek numune ayırma uygulamalarını gerektirir. ISO 14488: 2007 [3], tanımlanan bir güven seviyesi ile temsili olarak kabul edilebilen ve özellikle tanecik boyutu, tanecik boyutu dağılımı ve yüzey alanı ölçümleriyle ilgili olan tanımlanmış bir tanecikli malzeme numunesinden (toz, macun veya süspansiyon) bir test alikotunu elde etme yöntemlerini belirtir.

Tanecik kirleticilerinden / safsızlıklarından kaynaklanan sonuçların yorumlanmasındaki olası hataları ortadan kaldırmak için, saflığı da dahil olmak üzere test malzemesinin karakterizasyonundan elde edilen veriler ve teknik olarak mümkünse, belirlenen kirletici ve safsızlık miktarları çalışma öncesinde, madde tanımlama gerekliliği ile tutarlı olarak ele alınmalıdır.

Ayrıca numune hazırlama ile ilgili olarak, nanomalzemelerin agregalarının ve aglomeratlarının dağılım, toz ve aerosol formlarında oluşabileceğinin ve bunların varlığının sentez yöntemi, depolama, elleçleme ve çevresel koşullar gibi bir dizi faktörden etkilendiğinin bilinmesi gerekir. "Agrega", güçlü bir şekilde bağlı veya kaynaşmış taneciklerden oluşan (daha büyük) bir tanecik anlamına gelir. "Aglomerat", zayıf şekilde bağlanmış taneciklerin bir koleksiyonu anlamına gelir. (Nanomalzemenin tanımına ilişkin EC Tavsiyesi).

Agglomerasyon veya agregasyon durumu, nanomalzemelerin karakterizasyonunun ve testinin yorumlanmasını etkileyen önemli bir parametre olarak kabul edilir ("alındığı gibi", "kullanıldığı gibi", "dozlandırıldığı / açıklandığı gibi") ve bu nedenle numune hazırlama sırasında dikkate alınmalıdır. Aerodinamik/ışık saçılımı özellikleri ölçülerek veya elektron mikroskobu ([6], [7]) ile belirlenen etkin kesitsel çap dahil olmak üzere agglomerasyon veya agregasyon durumunu değerlendirmek için ölçülen bir dizi büyüklük önerilmiştir.

Su ortamındaki nanomalzemelerin agglomerasyon davranışı ve çözünme hızına ilişkin taslak test rehberleri ve rehber belge, OECD bünyesinde geliştirme aşamasındadır ve agglomerasyon davranışının karakterizasyonuna ve nicellendirilmesine izin verecektir (bkz. Bölüm 2.2.2).

Agregasyon ve agglomerasyona ilave olarak, taneciklerin sıvı ortamdaki davranışı, tanınması gereken bazı ek önemli hususlar ve zorluklar sunar. Özellikle, bir nanomalzemenin ne zaman dağıldığını ve ne zaman küçük tanecik boyutundan dolayı çözündüğünü ayırt etmek zor olabilir. Çözünürlük ve dağılılabirliğin iki ayrı durum olduğunu kabul etmek önemlidir. Çözünürlük, bir malzemenin (çözünen) başka bir malzemede (çözücü) tek, homojen, kararlı bir faz oluşturacak şekilde çözünebilme derecesidir ve katılar, sıvılar ve gazlarla ilgilidir. Dağılılabirlik, parçacık halindeki bir malzemenin başka bir malzemede (dağılma ortamı veya sürekli faz) homojen olarak dağılabilme derecesidir. Geçmişte, "çözünmüş" terimi, 0.45 µm'lik (veya benzeri) bir filtreden geçen sıvı bir numunenin bileşeni anlamına gelmiştir. Bununla birlikte, nanotaneciklerin (koloidal) dağılımları da bu tür filtrelerden geçebileceğinden, "çözünmüş" teriminin kullanımının gerçek çözeltilerin oluşumu ile sınırlandırılması ve hem sıvıların, hem de taneciklerin mevcut olduğu yerlerde "dağılmış" teriminin kullanılması önerilir ([2], [8]).

Ultrasantrifüjleme ve ultrafiltrasyon tekniklerinin bir kombinasyonunu uygulayarak, gerçekten çözünür oran miktarını ölçmek mümkündür (bakınız [4] ve [9]).

Dağılma, bir sıvı ve ince şekilde dağılmış katı malzeme içeren heterojen bir nanomalzeme karışımının süspansiyonudur ve bu, yanlışlıkla bir çözeltinin görünümüne sahip olabilir. Dağılım kararlılığı, numune hazırlama bağlamında değerlendirilmek için önemli bir parametredir. Taneciklerin dağılımı, tanecik-tanecik etkileşimlerinin yanı sıra tanecikler ve onları çevreleyen matrisler arasındaki moleküller arası kuvvetler tarafından belirlenir.

Çekici kuvvetler (örneğin, van der Waals etkileşimleri) nedeniyle tanecikler, yüzey yükü veya sterik etkilerle kararlı hale getirilmedikçe aglomerat eğilimi gösterir. Sonuç olarak, dağılım durumu dinamiktir ve potansiyel çözünmeye ve/veya daha yüksek aglomerasyona kadar zamanla değişir.

Dağılım, nanotaneciklerin özellikleri ile nanotanecikleri çevreleyen matrisin özellikleri arasındaki etkileşimlerle belirlenir. Sıvı ortamda, pH, iyonik kuvvet ve moleküler bileşenlerin konsantrasyonlarındaki küçük değişiklikler, taneciklerin dağılımını önemli ölçüde değiştirebilir. Aerosol haline getirilmiş tozlar için, aerosolün konsantrasyonu ve yayılma özellikleri dağılım durumunun zamanla değişmesine neden olabileceğinden, durum daha da karmaşık olabilir.

Dağılım durumu tipik olarak karşılaştırmalı tanecik boyutu ölçümleri kullanılarak değerlendirilir ve malzemenin temel tanecik boyutu dağılımını ölçmek için güvenilir bir yöntem gerektirir. Tanecik boyutu dağılımındaki değişiklikleri karşılaştırarak, nitel bir değerlendirme veya dağılım durumunun temsili bir ölçümü yapılabilir. Küresel tanecikler için geçerli ölçüm yöntemlerine bir örnek olarak: Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile birleştirilen Zeta potansiyeli ölçümü, nanotanecik dağılımlarının kararlılığının izlenmesini ve elde edilecek aglomerasyon sürecinin niteliksel bir anlayışını da sağlar. Tanecik izleme analizi gibi diğer yöntemler de test edilen madde için uygulanabilir olduğunda kullanılabilir [10].

2.1.1.1 (Eko)-Toksikolojik test için genel hususlar

Uygun numunenin hazırlanması ile başlamak için, İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenlik Testi için Numune Hazırlama ve Dozimetri Rehberi OECD No. 36 ENV/JM/MONO(2012)40 dikkate alınmalıdır. Numune hazırlama hakkındaki daha fazla rehber İmal Edilen Nanomalzemelerin Ekotoksikoloji ve Çevresel Davranışı: Test Rehberi OECD No. 40 ENV/JM/MONO(2014)1 [8], ENV/JM/MONO(2014)1/ADD1 [11] içerisinde bulunabilir ve İmal Edilen Nanomalzemelerin Test Programı sırasında OECD'nin nanogüvenlik konusundaki çalışmalarının tartışma sonucu yansıtılmıştır [13].

Örneğin, numune hazırlamada aşağıdaki hususların önemli olduğu kabul edilir:

- Nanomalzemelerin fizikokimyasal özelliklerinin karakterizasyonu (örneğin, tanecik boyutu dağılımı, şekli, özgül yüzey alanı, bileşim, safsızlıklar ve yüzey kimyası) ve test ortamındaki mevcut durum (aglomerasyon/çöktürme derecesi).
- Nanomalzemeler test maddesinin hazırlanması ve dağılımı (kararlılık dahil) test ortamının özelliklerini göz önünde bulundurmalıdır [4]. (Eko)toksikolojik test ortamındaki özel yapıları nedeniyle, nanomalzemelerin fiziko-kimyasal özellikleri ve potansiyel (eko)toksikolojik etkileri, bu ortamdaki biyo-fizikokimyasal çevre ile etkileşimlerden oldukça etkilenir. Bu nedenle, maruz kalma konsantrasyonunu izlemek için gereken testler eşlik eden analizlerle yapılmalıdır. Nanomalzemeler için sadece kimyasal analizin kullanılması, daha sonra doz ölçütleriyle ilgili tartışmada daha ayrıntılı olarak açıklandığı üzere yeterli değildir.
- Toz kullanımını ve/veya sonlanma noktasına bağlı dağılımı içeren test aşamalarında olduğu gibi numune hazırlamanın kontrollü, tutarlı, güvenilir ve kapsamlı olması gerekir ve test maddesi çok aşamalı bir hazırlık sürecinden geçmiş olabilir.
- Seçilen numune hazırlama prosedürü (ve uygulanıyorsa kontroller) gerekçelendirilmeli ve kapsamlı çalışma özetinde yeterince rapor edilmelidir.
- En uygun doz ölçütleri bilinemeyebileceğinden, yüzey alanı ve tanecik sayımları gibi kütle esaslı olmayan diğer doz ölçütlerinin kullanımı, mevcut olduğunda kütle ölçülerine ek olarak sağlanacaktır. Bu ölçümler, dozları kütleden tanecik sayımlarına ve/veya yüzey alanına dönüştürme kabiliyetini artıracaktır ve metrikler bağımsız olarak kullanıldığında dönüşümle ilgili belirsizliği azaltırken, sonuç olarak gerekli test miktarını azalttığı için gerekli kabul edilir.

Bir nanomalzeme çözünür ise ve ilgili biyolojik veya çevresel ortamda yüksek bir çözünme hızına sahipse (bkz. Bölüm 2.2.1), bu durumda test sistemine moleküler veya iyonik formunda sunulması muhtemeldir ve bu nedenle, nanomalzemedan kaynaklanan metal iyonik forma karşı pozitif referans olarak kullanılan metalik maddelerin tuzları gibi nano ölçekli olmayan çözünmüş maddelerle aynı cevaba neden olur. Bununla birlikte, araştırılan nanomalzeme biyolojik veya çevresel ortamda çözünmez veya az çözünürse, muhtemelen test sistemine bir tanecik formunda sunulacaktır. Bu durumda, *Bölüm R.7a (bu belge), R.7b ve R.7c için geçerli olan nanomalzemelere ilişkin Eklerde* verilen tavsiyeler geçerli olacaktır.

Ek olarak, nanotanecikler sıvı faz bileşenleriyle etkileşime girerek, genel toksisiteyi ve davranış süreçlerini etkileyebilecek kısmen veya tamamen çözünebilir veya dağılmış dönüşüm ürünleri (ayrıca bazı çözünmüş nanomalzemelerin kendisi) verebilir. Bu olasılığın, ortam ve süreçlerin seçilmesinde ve ayrıca herhangi bir testin sonucunun değerlendirilmesinde dikkate alınması gerekir ([2], [14]).

Numune hazırlama sırasında dikkate alınması gereken diğer önemli hususlar, kirleticiler maddelerin (biyolojik kirleticiler dahil) ve safsızlıkların (eko) toksikolojik test sonuçları üzerindeki etkisini içerir. Örneğin, nanotaneciklerin üretim sürecinde kullanılan Co ve Ni katalizörleri gibi metalik safsızlıkların zebra balığı embriyolarında (örneğin [15]) yumurtadan çıkmayı inhibe ettiği gösterilmiştir.

Nanomalzemeler için özellikle endişe verici olan, endotoksinin belirli test sonuçları üzerindeki etkisidir. Endotoksin (lipopolisakkarid), gram-negatif bakterilerin dış hücre duvarının bir bileşenidir ve bu nedenle ortamda her yerde bulunur. Bununla birlikte, endotoksin, ateş, "endotoksin şoku" ve ölüm gibi cevaplara neden olan organizma seviyesinin tümünde veya proinflatuar araçların salgılanmasına yol açan proinflatuar kaskadların tetiklenmesi yoluyla hücresel düzeyde bir dizi toksik etki oluşturabilir.

Biyolojik tayinlerde endotoksinin oluşturabileceği güçlü cevap nedeniyle, kontamine olmuş bir test numunesinin toksisite testleri sonuçlarının (potansiyel bir yanlış pozitif dahil) karıştırılmasına neden olabilir. Bu nedenle, bir test numunesinde endotoksin varlığının veya seviyesinin belirlenmesi, toksikolojik test için bir numunenin hazırlanması sırasında önemli bir ön işlemdir. Endotoksin, Avrupa Alternatif Test Yöntemlerinin Doğrulanması Komitesi tarafından onaylanan ve tasarlanmış, araştırma dereceli nanomalzemelerin pirojenitesini belirlemek için güvenilir bir yöntem olarak önerilen makrofaj aktivasyonu testi gibi in vitro yöntemler kullanılarak ölçülebilir [16]. Nanomalzemelerin test edilmesi için uluslararası standartlar mevcuttur [17]. Kontaminasyonla ilgili sorunların nanomalzemelere özgü olmamasına rağmen, diğer taneciklere kıyasla nanofaz sistemlerinin artan bağıl yüzey alanı, yüzeye tutunan olası endotoksin miktarlarının (örn. gram malzeme başına yüzeye tutunan gram endotoksin) anlamlı olduğu anlamına gelir [18].

Yanlış negatiflerin varlığı, örneğin organizmanın maruz kalmasının hafife alındığı durumlarda (yani, Ames testi, çözünmeyen tanecikler vb.) hesaba katılmalıdır. Nanomalzemeler ve farklı test ortamlarındaki normal kimyasallar arasındaki durum ve davranış farklılıklarından dolayı, nanomalzemeler için OECD No. 40'ta [8] önerilen dağılma, çözünme, dağılma kararlılığı ve agregasyon üzerine bir test stratejisi/karar şeması yaklaşımı düşünülebilir. Bu yaklaşım, örn. pH, DOM, NOM/proteinler ve iyonik kuvvetlerin etkilerini dikkate alır ve OECD tarafından geliştirilen özel test rehberleri ve rehber dokümanlar kamuya açık hale gelene kadar göz önünde bulundurulmalıdır (bkz. 2.1.1). Ortamdaki çözünme hızı ve dağılma kararlılığının dikkate alınması ve ölçülmesi, yalnızca uygun test stratejisinin ve test koşullarının bulunmasına yardımcı olmayacak, aynı zamanda sonuçların yorumlanmasına da yardımcı olacaktır. Bu bilgi ayrıca nanomalzemelerin gruplanması ve çapraz okuması [1] için yararlı olacaktır.

2.2 Sonlanma noktaları için özel tavsiye

2.2.1 Suda çözünürlük

Suda çözünürlük, ana rehberin Bölüm R.7.1.7'sinde ele alınmıştır. Nanomalzemeler söz konusu olduğunda, suda çözünürlüğün azalan tanecik boyutlarından dolayı nano boyut aralığındaki malzemeler için artma potansiyeline sahip olduğunu ve ayrıca şekil ve yüzey kaplamalarından etkilenebileceğini göz önünde bulundurmak gerekir. Nanomalzemeler için, çözünme hızı ve dağılım derecesi de maddenin hareketliliğinde önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, küçük tanecik boyutundan dolayı bir maddenin ne zaman dağıldığını ve ne zaman çözündüğünü ayırt etmek zor olabilir. Çözünürlüğün ve dağılılırlığının, test ve karakterizasyon üzerindeki farklı sonuçları ile farklı ve ayrı olaylar olduğunu bilmek ve aralarında ayırım yapmak önemlidir. Bu durum nanomalzemelere özgü değildir ve aslında ana rehber, "eser miktarda çözünür bileşiklerin çözünürlüğünün ölçülmesinin, dağılmış malzeme eklenmeden malzemenin doymuş çözeltilerinin oluşturulması için son derece dikkatli olmayı gerektirdiğini" vurgulamaktadır. Bununla birlikte, bu problem eser miktarda çözünür nanomalzemeler durumunda daha da güçlendirilebilir. Bu konularla ilgili daha fazla bilgi, Numune Hazırlama ile ilgili bölüm 2.1.1'de verilmektedir. Ayrıca, çözünmemiş malzemenin çözünmüş malzeme olarak ölçülen miktara katkıda bulunmadığından da emin olunmalıdır.

OECD, nanomalzemeler için test rehberlerinin uygulanabilirliğini incelemiştir ve OECD yayınları, OECD Test Rehberi 105 [19]'un (Suda çözünürlük) nanomalzemelerin test edilmesi için her zaman uygun olmadığını belirtmiştir [11].

Bu, söz konusu maddenin suda düşük çözünürlüğe sahip olduğu ve bir dağılım oluşturma olasılığının da mevcut olduğu durumdur. OECD Test Rehberi 105 rehberi kullanılarak suda çözünürlüğün ölçülmesi, suda çözünür olan ve yüksek ve hızlı bir çözünme hızına sahip nanomalzemeler için yine de değerli olabilir.

2.2.1.1 Çözünürlük için diğer rehberler ve protokoller

Destekleyici bilgi olarak ve/veya OECD Test Rehberi 105'in uygulanamadığı durumlarda alternatif bir yöntem olarak, ilgili biyolojik ve çevre ortamındaki çözünme hızının (biyolojik) ortamdaki maddelerin biyoyararlanımını etkilediği göz önüne alındığında, çözünme hızının ve kapsamının ölçülmesi önemle tavsiye edilmektedir (OECD No. 62 [20]). Örneğin, çözünme hızı ile ilgili veriler, sucul toksisite testi için hangi tür testin gerekli olduğunu belirlemede faydalı olabilir (örneğin *Ek R.7-1 - Kısım R.7b'*deki bölüm 1.2.1'e bakınız).

OECD 29 [21], 1 ila 28 gün arasında değişen test süresi için çözünme ve dönüşümü test etmeye izin verir ve genelde 7 günlük bir süre uygulanır. Bu sonlanma noktası için test malzemesi seçerken, nanomalzemeler söz konusu olduğunda en küçük tanecik boyutunun test edilmesinin (rehberde tavsiye edildiği üzere) yeterli olmayabileceği unutulmamalıdır.

OECD 62 [20], esas olarak çözünme hızına ve yüksek veya > %70 başka bir formda çözünme, %10 ila 70 arasında orta, > 1 ve %10'un altında düşük ve < %1 ihmal edilebilir olmak üzere nitel eşiklerinin düzenlenmesine odaklanmaktadır (hepsi 7 günlük bir test süresi için tahmin edilmiştir).

Dönüşüm/çözünme hakkındaki OECD 29 test protokolü [21], metallerin ve az çözünür metal bileşiklerinin sucul ortamda mevcut çözünür iyonik ve diğer metal taşıyan türleri üretebilme hızının ve kapsamının nasıl belirleneceği konusunda tavsiyeler sağlar. Çözünme hızının ölçümü ve OECD No. 62'de daha da geliştirilen niteliksel eşikler, dönüşüm/çözünme protokolünün metalik nanomalzemelere nasıl uygulanacağı konusunda daha fazla tavsiye sağlar. Ayrıca, OECD içinde geliştirilmekte olan nanomalzemelerin çözünme hızını belirlemek için, mevcut olduklarında OECD 29 yerine geçerli olacak iki ek test rehberi vardır:

- Nanomalzemelerin Sucul Ortamda Çözünme Hızı için Test Rehberi,
- Sucul Ortamda Nanomalzemelerin Aglomerasyonu ve Çözünme Davranışına İlişkin Rehber Dokümanı.

Aglomerasyon ve agregasyon ölçümleri, mevcut olduğunda yukarıdaki rehber belgeleri kullanan çözünme hızı ile birlikte yararlı olabilir.

2.2.1.2 Bir feragat olarak çözünürlük (çözünmezlik)

Ana Rehber Bölüm R.7.1.7.1'de, suda çözünmezliğin belirli fizikokimyasal ve ekotoksikolojik sonlanma noktalarından feragat etmek için düzenleyici bir tetikleyici olarak kullanıldığı belirtilmektedir. Ancak nanomalzemeler için çözünmezlik testten feragat etmek için tek başına bir gerekçe olarak uygun değildir. Bir nanomalzemenin yüksek çözünmezliği, toksisitenin olası olmadığını göstermez. Çözünmeyen bir nanomalzeme bile boyut ve dağılılabirlik gibi nanoya özgü özellikler nedeniyle test organizmaları tarafından biyolojik olarak kullanılabilir olabileceğinden, maruz kalma göz ardı edilemez. Ayrıca, yüksek oranda çözünmeyen maddeler için uygun olmayan test rehberleri, özel bir uyarlamayla nanomalzemeler için geçerli olabilir.

Nanomalzemelerin çözünürlüğünün OECD Test Rehberi 105 (Suda çözünürlük) gibi mevcut standart yöntemlerle değerlendirilmesindeki nanoya özgü özellikler ve kısıtlamalar göz önünde bulundurularak, yüksek çözünmezliğe bağlı bilgi gerekliliğinden feragat etmek, her zaman kapsamlı teknik ve bilimsel gerekçelerle desteklenmelidir.

Örneğin, çözünme, aglomerasyon ve çöktürme hakkındaki daha fazla bilgi, alternatif bir test stratejisini (örneğin bir çökelti toksisitesi testi dahil) gerekçelendirmek için kanıt ağırlığının bir parçası olarak kullanılabilir.

2.2.2 n-oktanol/su dağılım katsayısı

Ana rehberin R.7.1.8.3 Bölümü, test yöntemleri dahil olmak üzere n-oktanol/su dağılım katsayısına ilişkin deneysel veriler ile ilgili bilgileri içerir. n-oktanol / su dağılım katsayısı (K_{ow}), büyük ölçüde karışmayan çözücüler n-oktanol ve sudan oluşan iki fazlı bir sistemde çözünmüş bir maddenin denge konsantrasyonlarının oranı olarak tanımlanır. İki fazlı bir sistemde nanotanecikler organik moleküllerden farklı davranır. Nanotaneciklerin davranışı, tanecik yapısından dolayı su ve n-oktanol olmak üzere iki faz arasında dağılımları sonucunda termodinamik dengeye ulaşamadığı için denge dağılımı ([22], [23]) ile tahmin edilemeyebilir. Bu nedenle, n-oktanol/su dağılım katsayısı için ana Rehberde önerilen OECD Test Rehberleri, yani OECD Test Rehberi 107, OECD Test Rehberi 117 ve OECD Test Rehberi 123, çoğu durumda nanotanecikler için geçerli değildir ([6], [8], [12]). Sonuçlar, imal edilen nanomalzemenin tamamen çözünmemesi durumunda mevcut olabilecek bir koloidal süspansiyonun varlığından etkilenebilir ([2], [8]).

Bununla birlikte, nanomalzemenin hızlı ve yüksek oranda çözündüğü gösterildiğinde ve parçacıkların varlığı hariç tutulabildiğinde, ana rehber geçerli olacaktır. Yukarıdakileri dikkate alarak, n-oktanol/su dağılım katsayısının ölçümü, suda çözünür olan ve yüksek bir çözünme oranına sahip organik nanomalzemeler için hala değerli olabilir (bkz. Bölüm 2.2.1).

n-oktanol/su dağılım katsayısının (K_{ow}) kullanılması, çevresel davranışın veya biyokonsantrasyonun yanlış yorumlanmasına yol açabilir [22]. Nanomalzemelerin n-oktanol/su dağılım katsayısının (K_{ow}) mevcut standart yöntemlerle değerlendirilmesindeki nanoya özgü özellikleri ve kısıtlamaları dikkate alarak, n-oktanol/su dağılım katsayısına dayanılarak bilgi gerekliliğinden feragat edilmesi, kullanılan test yönteminin (örneğin, suda çözünür veya yüksek ve hızlı bir çözünme hızına sahip nanomalzeme) uygulanabilirliğine ilişkin kapsamlı bir teknik ve bilimsel gerekçeyle her zaman desteklenmelidir.

Ana Rehber bölüm 7.1.8.3, "Test edilmesi zor maddeler" ile ilgili olarak, nanomalzemelerin küçük tanecik boyutundan dolayı, bir maddenin ne zaman dağıldığını ve ne zaman çözündüğünü ayırt etmenin zor olabileceğine dikkat edilmelidir. Çözünürlüğün ve dağılılabirliğin iki ayrı olay olduğunu bilmek ve aralarında ayırım yapmak önemlidir.

Bu konularla ilgili daha fazla bilgi, Numune Hazırlama ile ilgili bölüm 2.1.1'de verilmektedir.

2.2.2.1 K_{ow} için diğer rehberler ve protokoller

Nanomalzemeler ile ilgili olarak, şu anda n-oktanol/su dağılım katsayısına alternatif olarak çevrede ve biyolojik ortamdaki nanomalzemelerin davranışını ve taşınmasını tahmin etmek üzere davranış tanımlayıcıları için uygun standart yöntemler yoktur ([22], [23]). Bununla birlikte, çevredeki ve organizmalardaki nanomalzemelerin davranışını ve taşınmasını tahmin etmek için kullanılabilir denge dağılımından başka özellikler vardır. Aglomerasyon, agregasyon, birikim ve bağlanma, nanotaneciklerin davranışını tahmin etmek için bilgilendirici özellikler olarak kabul edilir ([22], [24], [25], [26]). Nanotanecikler için alternatif davranış tanımlayıcıları, yüzeye tutunma/yüzeyden sıyrılma ile ilgili 2.2.4 bölümünde daha ayrıntılı olarak tartışılmaktadır.

OECD'de, nanomalzemelerin aglomerasyon davranışını belirlemek için aşağıdaki test rehberlerinin geliştirilmesine yönelik devam eden bir faaliyet bulunmaktadır:

- Farklı Sucul Ortamlardaki Nanomalzemelerin Aglomerasyon Davranışı için Test Rehberi [27]
- Sucul Ortamda Nanomalzemelerin Aglomerasyon Davranışı ve Çözünme Hızı için Rehber Doküman.

Nanomalzemelerin aglomerasyonunun değerlendirilmesi, mevcut olduğunda OECD test rehberine uygun olarak yapılacaktır³.

K_{ow} ölçümünün geçerli olmaması durumunda diğer test dışı yöntemler de düşünülebilir. Geliştirilmekte olan modellerin ve belirli parametrelerin bir listesi ve ayrıntıları Ek 1'de mevcuttur.

³ Taslak erişim adresi: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-guidelines-for-comments-section3-degradation-and-accumulation.htm>

2.2.3 Granülometri

2.2.3.1 RIP-oN 2 tarafından verilen tavsiyeye ilişkin genel hususlar

Granülometri, beklendiği gibi nanomalzemeler için temel sorundur. Bu nedenle, nanomalzemeleri kapsayanlar arasında en çok tavsiyeyi gerektiren sonlanma noktasıdır. Değişiklik ihtiyacı, "granülometri" terimi tarafından kapsanan şeyin tanımıyla başlar.

Bu sorunla ilgili olarak, RIP-oN2 raporu iki alternatif sunar:

- Granülometri yalnızca tanecik boyutu dağılımını ifade eder
- Granülometri, tanecik boyutu dağılımına ilave olarak şekil ve yüzey alanını içerir

RIP-oN raporu farklı alternatifler sunar, ancak tavsiye özünde aynıdır: şekil ve yüzey alanı dikkate alınması gereken parametrelerdir (örneğin toksikoloji üzerindeki etki nedeniyle), bu nedenle ya granülometri ile birlikte kabul edilirler ya da yeni sonlanma noktaları olarak önerilirler.

Bu ekteki granülometri bölümünün yapılandırılması amacıyla, okuyucu için granülometri ile ilgili metnin kapsamını yalnızca tanecik boyutu dağılımını dikkate alacak şekilde sınırlamanın ve şekil ve yüzey alanı tartışması için iki ek bölüm eklemenin daha açık ve daha yararlı olduğu düşünülmüştür.

Bölümler, şekil ve yüzey alanı tartışması için tamamen yeni olduğundan, orijinal rehber yapısı korunmuştur ve bu ekte numaralandırılmış olarak belgenin gövdesinde yeni bölümler gibi görünmektedir (Bölüm R.7.1.19 ve R. 7.1.20).

Son olarak, üç parametre (tanecik boyutu dağılımı, şekil ve yüzey alanı) için ortak bir tanımlanmış numune alma stratejisini gösteren yeni bir Bölüm 2.2.3.3 eklenmiştir.

2.2.3.2 Granülometri için tavsiyeler (tanecik boyutu dağılımı olarak)

Taneciklerin çalışma sahasına veya çevreye potansiyel salımı, birçok endüstriyel sürecin tasarımında ve işletiminde ve maddelerin güvenli bir şekilde elleçlenmesinde önemli bir husustur. Taneciklerin salımı, bir güvenlik zararlılığı oluşturabilir, insanlar üzerinde olumsuz sağlık etkilerine neden olabilir ve çevreyi etkileyebilir. Bu nedenle, risklerin değerlendirilmesine, kontrol edilmesine ve en aza indirilmesine olanak tanıyacak şekilde maddelerin tanecik olarak salım eğilimi hakkında veri elde etmek önemlidir. Toz (powder) halindeki maddelerden tanecik salımının ölçümü, bir tozun (powder) tozluluğunun normal ölçümüne benzerlik gösterir, ancak farklı tanecik boyutu aralıklarına uygun yöntem ve cihazlandırmalarda anlamlı farklılıklar vardır. Havadaki oranının tanecik boyutu dağılımının ve davranışının, toz halindeki madde için belirlenenlerden farklı olabileceğine dikkat etmek önemlidir.

Tanecik boyutu, dağılmış malzemelerin temel bir özelliğidir. Bir grup tanecik farklı boyutlarda olduğunda, bir tanecik boyutu dağılımı ile açıklanabilirler. Granülometri, tanecik boyut dağılımının belirlenmesi olarak tanımlanabilir. Bir grup tanecik farklı boyutlarda olduğunda, bunlar daha sonra bir Tanecik Boyutu Dağılımı ile tanımlanabilir.

Bölüm R.7.1.14, Avrupa standardı EN 481 "Çalışma Alanı Ortamları - havada taşınan taneciklerin ölçümü için boyut oranı tanımları"ndan [28] alıntı yapmaktadır. Standart, içe çekilebilir, torasik ve solunabilir boyut oranlarının tanımlarını ve bu oranları ölçmek için numune alma cihazları için hedef özellikleri (düzenlemeleri) sağlar. Bu belgeye ek olarak aşağıda önerilen belgeler, çalışma alanında maruz kalmaları etkin bir şekilde karakterize etmek ve izlemek için mevcut son teknolojiyi temsil eden temel bilgiler ve numune alma rehberleri sağlar:

- Zararlı Maddelerin Belirlenmesi Yöntemi MDHS 14/3 "İçe çekilebilir ve solunabilir tozların numune alımı ve gravimetrik analizi için genel yöntemler" [29]

- "Sabit kaynak emisyonları - Düşük konsantrasyonlarda tanecikli maddenin (toz) kütle konsantrasyonunun belirlenmesi - manuel gravimetrik yöntem" [30]
- "Sabit kaynak emisyonları - Tanecikli maddenin kütle konsantrasyonunun manuel olarak belirlenmesi" [31]
- "Ortamın hava kalitesi - Askıda tanecikli maddenin PM2.5 kütle oranının belirlenmesi için standart gravimetrik ölçüm yöntemi" [32]
- "Çalışma alanı ortamları - Ultra ince, nanotanecik ve yapılandırılmamış aerosoller - Soluma yoluyla maruz kalma için karakterizasyon ve değerlendirme" [33]
- "Nanoteknolojiler - Nanoteknolojilerle ilgili mesleki ortamlarda sağlık ve güvenlik uygulamaları" [34]

Son iki rapor (yukarıdaki listeden nanomalzemelere özgü olan yalnızca ikisi), uygun oranların ölçülmesine atıfta bulunurken de ilgilidir.

Öngörülebilir olduğu üzere, granülometri için test yöntemlerini ele alan Bölüm 7.1.14.2 (Granülometri hakkında mevcut bilgiler), değişikliğe en çok ihtiyaç duyan bölümdür. Bu nedenle, RIP-oN tarafından değiştirilmesi önerildiği üzere, Bölüm R.7.1.14.2'nin metninin tamamını burada yeniden oluşturmaktayız.

R.7.1.14.2 Granülometri hakkında mevcut bilgiler

Granülometri üzerine test verileri

Taneciklerin karakterizasyonu, çok dikkatli numune alma ve izlenecek numune ayırma uygulamalarını gerektirir. ISO 14488: 2007 [35], tanımlanmış bir güven seviyesiyle temsili olarak kabul edilebilecek tanımlanmış bir tanecikli malzemenin (toz, macun, süspansiyon) numunesinden test alikotunun elde edilme yöntemlerini belirtir. Daha fazla bilgi bu ekin Numune Hazırlama ile ilgili Bölüm 2.1.1'inde mevcuttur.

Tanecik boyutu ölçümleri için pek çok yöntem mevcuttur, ancak bunların hiçbiri tüm boyut aralığına uygulanamaz (bkz. Tablo 1 - 4). Tanecik özelliklerinin tam olarak anlaşılmasını formüle edebilmek için mümkün olan yerlerde birden fazla teknik kullanılmalıdır ve gerekli olan optimum teknikler seti, araştırılan belirli madde ve biçime göre seçilmelidir. Tanecik boyutu dağılımını belirleme yöntemleri, suda ve havada çözünmeyen taneciklerin taşınması ve çökmesi hakkında bilgi sağlamak için tasarlanmıştır. Tanecik boyutu dağılımının ölçümüne uygulanabilen OECD test rehberi OECD Test Rehberi 110'dur. Sadece $2 \mu\text{m} < R_s < 100 \mu\text{m}$ aralığında yararlı olduğu için OECD Test Rehberi 110 Yöntem A'nın (çöktürme veya santrifüj) nanomalzemelere [36] uygulanamayacağına dikkat etmek önemlidir. Bununla birlikte, alternatif standartlaştırılmış ekipman (örneğin, santrifüjlü çöktürme) bu yöntemde uygun olarak kullanılabilir. OECD Test Rehberi 110'un (elektron mikroskopu) B Yöntemi, nanomalzemeler için (yani, uzunluğu 5 mikrondan az ve çapı 100 nm'den az olan tanecikler/lifler) veri raporlamasında gerekli ancak küçük bir sapma gerektirir. Nanotanecik boyutu dağılımlarını ölçebilen yöntemlerin ayrıntıları, ISO/TR 27628:2007 [33] ve ISO/TR 12885:2008 [34]'te verilmiştir.

Bu yöntemler genellikle uygulanabilir ve sıklıkla kullanımdadır. Hem lifli hem de lifli olmayan taneciklerin etkili hidrodinamik yarıçapını, diğer tanecik boyutu ve yoğunluk ölçümlerinden dolaylı olarak önceden denetlenmeden hesaplamak için kullanılırlar. Doğru bir şekilde uygulandıklarında, mevcut aerodinamik özellik ve kütle oranlarının bir tahminini temsil ederler ve bu nedenle solunabilir taneciklerin mevcut olup olmadığını gösterebilirler. Suda çözünmeyen (yani suda çözünürlük $< 10^{-6}$ g/l) maddelere uygulanabilir ve 5 nm-100 μm aralığını kapsar

Lif oluşturabilen malzemeler söz konusu olduğunda; başlangıçta taneciklerin (örn. plakalar, iğneler, vb.) yaklaşık doğasını belirlemek için hafif mikroskopik inceleme kullanılarak doğrulanmış, soluma veya yutmadan kaynaklanan potansiyel sağlık zararlılıklarının belirlenmesine yardımcı olmak için ek bir ölçüm seti önerilir. Bu nispeten özelleştirilmiştir, nadiren gereklidir ve özel mikroskopik incelemeyi (örneğin TEM, SEM) içerir. Lif: en boy oranı (uzunluk/çap > 3) ve çapı $< 100 \mu\text{m}$ olan suda çözünmeyen bir taneciktir.

Lifli taneciklerin görünüş oranlarını belirlemek için tanecik boyutunun görüntü analizi kullanılabilir. Görüntü analizi, her bir taneciğin görüntülerini doğrudan yakalayarak veri üretir. Tanecik boyutundaki ince farklılıklar doğru bir şekilde karakterize edilebildiğinden, bu kullanıcılara nihai hassasiyet ve çözünürlük sağlar. Her bir taneciğin görüntüleri de kaydedilir, bu da verilerin daha fazla görsel doğrulamasını sağlar ve ayrıca aglomerasyon, kırılma ve yabancı tanecikler gibi önemli olayların tespitini sağlar. Bir dizi endüstri (örn. farmasötikler, biyoteknoloji, aşındırıcılar, seramikler, polimerler, patlayıcılar ve tonerler) ürünlerini karakterize etmek için görüntü analizi sistemlerini giderek daha fazla kullanmaktadır.

Tablo 1: Malzemenin tanecik boyutu dağılımını olduğu gibi belirleme yöntemleri

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralığı	Veri türü
<p>Optik mikroskopik inceleme</p> <p>Taneciklerin şeklini ve boyutunu etkilememek için numunelerin doğrudan hazırlanması tercih edilir. Bu yöntem, içe çekilebilir ve solunabilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirler ve havayla taşınan toz ile dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikleri ifade etmez.</p> <p>Optik mikroskopi, bilinen lifli veya lif salan maddeler veya diğer verilerle benzerlikleri karşılaştırarak liflerin mevcut olma olasılığını incelemek için kullanılabilir. Lifin kırılmasını ve topaklanmasını önlemek için numune hazırlama sırasında çok dikkatli olunması gerekir. Havadaki liflerle kontaminasyonu önlemek için de özen gösterilmelidir. Numuneler şu şekilde hazırlanabilir:</p> <p>(a) hafifçe elle çalkalama veya vorteks karıştırma yoluyla suda süspansiyon oluşturarak veya kuru malzemenin bakır bant üzerine doğrudan aktarılmasıyla veya kuru liflerin atomizör veya pipet kullanılarak püskürtülmesi yoluyla hazırlanabilir.</p> <p>(b)</p> <p>Uzunluk ve çap dağılımları bağımsız olarak en az iki kez ölçülmeli ve en az 70 lif sayılmalıdır. Belirli bir histogram aralığında hiçbir değer >% 50 veya 3 fiber (hangisi daha büyükse) farklılık göstermemelidir. Uzun ince liflerin varlığı, daha fazla, daha hassas ölçümlere ihtiyaç olduğunu gösterir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki liflerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Lifler dahil her çeşit tanecik Boyut aralığı: 0.2–5000 µm.</p> <p>0.2 µm kadar küçük ve 100 µm kadar büyük lif çapları ve 5 µm kadar küçük ve 300 µm kadar büyük lif uzunlukları</p>	<p>Tanecik yoğunluğu bilgisi ile kütle medyan aerodinamik çapının (MMAD) hesaplanabileceği tanecik boyutu/boyut dağılımı.</p> <p>DSÖ [37] tarafından tanımlanan lif numarası En boy oranı > 3:1, lif uzunluğu > 5 mikron</p>
<p>Eleme</p> <p>Tel örgü elekler ve delikli metal levha elekler kullanılarak eleme, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun değildir, çünkü aralıkları yalnızca 100-10.000 mikrondur. Mikro gözenekli (mesh) elekler (5-100 mikron aralığında) daha iyi sonuçlar verebilir. Bununla birlikte, bu elekler genellikle mekanik veya ultrasonik titreşim ile birlikte çalıştırıldıkları için, medyan boyut ve formda değişiklik meydana gelebilir.</p> <p>Eleme, solunabilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun değildir, ancak daha büyük taneciklerin belirlenmesi için uygun olabilir.</p>	<p>Kuru tozlar/granüller Boyut aralığı: 100–10.000 mikron (tel örgü/metal elekler) ve 5-100 (mikro mesh)</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>

<p>Sedimentasyon (yerçekimsel çökme)</p> <p>Yöntem, taneciklerin sıvı içinde yerçekimsel olarak çökmesine dayanır ve etkin hidrodinamik yarıçap belirlenir. Etkin hidrodinamik yarıçap dağılımı, iki değer arasında > % 20 farklılık görülmeyen şekilde 3x ölçülmelidir. Yarıçap dağılım eğrisini çözmek için yeterli sayıda yarıçap aralığı kullanılmasını gerektirir. Kalibrasyon malzemesi olarak lateks kürelerin ikili veya üçlü karışımları (2-100 mikron) önerilir.</p> <p>Yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Kuru tozlar/granüller Boyut aralığı: 2-200 mikron</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
<p>Elektriksel Algılama Alanı (örn. Coulter) yöntemi</p> <p>Numuneler, elektrolitik bir çözelti içinde süspansiyon haline getirilir. Parçacık bir açıklıktan çekilirken, iletkenlikteki değişiklik parçacık boyutunun bir ölçüsünü verir. Önemli parametre, hem yoğunluğa hem de çapa bağlı olan sıvı fazdaki çökme hızıdır. Birkaç g/cm³ yoğunluğa sahip tanecikler belirlenebilir.</p> <p>Akışkan içinde tam elektrik izolatör olan partiküllere uygulanabilir. Tanecikler ve akışkan arasındaki yoğunluk farkı çok büyük olmamalıdır.</p> <p>Yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Kuru tozlar/granüller (iletken olmayan) Boyut aralığı: 1-1000 mikron</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
<p>Faz Doppler Anemometrisi</p> <p>Pahalı bir tekniktir. Tanecik boyutu dağılımı havada veya sıvı içinde ölçülebilir. Yöntem, taneciklerin bilinen kırılma indisine sahip ve küresel olduklarını varsayar.</p> <p>Yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Kuru tozlar/granüller Boyut aralığı: 0.5-80 mikron (havada); 0.5-1000 mikron (sıvı halde)</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
<p>Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)</p> <p>TEM, ayırma ve numune alma cihazlarından olanlar dahil olmak üzere havadan toplanan veya bir TEM ızgarasında süspansiyon halinde hazırlanan numuneler için kullanılabilir. Toz hazırlama bu yöntem için oldukça kolay ve hızlıdır. TEM, taneciklerin boyutunun ve biçiminin niteliksel değerlendirmesini ve aglomeratlar ile birincil tanecikler arasında ayırt edilebilmeyi sağlar. Aglomerasyonun önemli olmadığı durumlarda birincil taneciklerin boyut dağılımının nicel tespiti yapılabilir. TEM, çok yüksek bir yerel çözünürlüğe (nm) sahiptir ve 0.2 nm'den daha iyi çözünürlükle kafes düzlemlerini ve atom sıralarını tek tek görüntüleme yeteneğine sahiptir. TEM'e yapılan eklemeler daha fazla bilgi sağlayabilir, örn. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM), Yüksek Çözünürlüklü TEM (HRTEM) veya Çevresel TEM kullanarak yerinde ölçümler, karakterize edilecek dağılmış numuneler için potansiyel sunar.</p>	<p>Katı, toz ve süspansiyon formundaki tanecikler. Boyut aralığı: < 0.1 - 10 µm.</p> <p>Tanecik boyutu aralığı 1-500 nm olan tanecikler için özellikle uygundur.</p>	<p>Tanecik yoğunluğu bilgisi ile sayı/kütle medyan çapının hesaplanabileceği tanecik boyutu/boyut dağılımı</p>

Bununla birlikte, TEM oldukça yoğun bir yöntemdir ve numunelerin manuel olarak hazırlanmasını gerektirir. Dağılımların seyreltilmesi (yaklaşık % 1'e kadar) veya yoğun iş gerektiren kriyo-kesitler halinde hazırlanması gerekir. Analiz için numunelerin vakum altında kurutulması, karakterize edilen taneciklerin boyutunu ve şeklini değiştirebilir. Numunenin son derece küçük bir alanı analiz edilir ve bu yeterince temsilci olmayabilir. Değerlendirilen taneciklerin nispeten küçük payı (yaklaşık 1.000), sınırlı istatistiksel kesinlik ile sonuçlanır. Sadece iki boyutlu bir tanecik izdüşümü görülebilir ve değerlendirilebilir; ve resimlerin yorumlanması zordur. Aglomerasyon anlamlıysa resim analizi imkansızdır. Bazı numunelerde tanecik konturları net bir şekilde çözülemeyebilir. Analiz edilecek görüntülerin kalitesi kritik öneme sahiptir ve yönelim etkilerinden kaynaklanan önyargılardan kaçınmak için özen gösterilmelidir.

Bu yöntemle ilgili daha fazla bilgilendirici bilgi ISO/TR 27628:2007 [33]'de mevcuttur. ISO/13322-1:2004 [38] ve ISO/13322-2:2006 [39], sırasıyla statik ve dinamik görüntü analizi ile tanecik boyutunu belirlerken ölçüm açıklaması ve doğrulaması için genel rehberlik sağlar.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM, ayırma ve numune alma cihazlarından olanlar dahil olmak üzere havadan toplanan veya bir SEM ızgarasında süspansiyon halinde hazırlanan numuneler için kullanılabilir. Numune hazırlama TEM için olduğundan daha kolaydır ve yalnızca az miktarda numune gerekir. Seyreltilmemiş dağılımlar ve emülsiyonlarla test mümkündür. SEM, numunelerin tahribatsız test edilmesini sağlar ve yüksek yerel çözünürlükte çok hassas boyut belirleme ile numune yapısının bir görüntüsünü sağlar. Bu yöntem Çevresel SEM olarak kullanılabilir.

Malzemenin temsili bir numunesi kullanılmalıdır. Numunelerin elektriksel olarak iletken olmadığı durumlarda, yüzeye yapışan taneciklerin bir iletken malzeme tabakası ile plazma püskürtmeli kaplaması genellikle gereklidir. Bu işlem, karakterize edilen numuneyi değiştirebilir. Numunenin sadece küçük bir bölümü resmedilmiştir ve görüntüleme, yüzey özellikleriyle sınırlıdır. Analiz edilecek görüntülerin kalitesi kritik öneme sahiptir ve yönelim etkilerinden kaynaklanan önyargılardan kaçınmak için özen gösterilmelidir.

Bu yöntemle ilgili daha fazla bilgilendirici bilgi ISO/TR 27628:2007 [33]'de mevcuttur. ISO/13322-1:2004 [38] ve ISO/13322-2:2006 [39], sırasıyla statik ve dinamik görüntü analizi ile tanecik boyutunu belirlerken ölçüm açıklaması ve doğrulaması için genel rehberlik sağlar.

Katı, toz ve süspansiyon formundaki tanecikler.

Boyut aralığı: < 0.01 - 10 µm.

Tanecik boyutu aralığı 10 nm - 1 µm olan tanecikler için özellikle uygundur.

Tanecik yoğunluğu bilgisi ile sayı/kütle medyan çapının hesaplanabileceği tanecik boyutu/boyut dağılımı

<p>Santrifüjlü Sedimentasyon (ISO 13318-1:2001 [40]; ISO 13318-2:2007 [41]; ISO 13318-3:2004 [42])</p> <p>Bir sıvı içinde dağılmış tanecikli malzemelerin tanecik boyutu dağılımını oranlama ile ölçer. Santrifüjlü sedimentasyon yöntemleri, bir sıvıdaki taneciklerin merkezkaç alanı altındaki çökme hızına dayanır. Yerleşme hızı ile tanecik boyutu arasındaki ilişki, düşük Reynolds sayılarında Stokes denklemine indirgenir. Bu nedenle, bu yöntemi kullanarak tanecik boyutunun hesaplanması Stokes yasasına bağlıdır. Bu teknik, OECD Test Rehberi 110 [36] Yöntem A'ya göre veri sağlamak için kullanılabilir.</p> <p>Optik bulanıklık tespitini kullanırken, ölçüm aralığı malzemenin yoğunluğuna, ortamın viskozitesine ve santrifüjün devir sayısına bağlıdır. Bir taneciğin standardı ile kalibrasyon yolu aracılığıyla tanecik boyutunun yüksek mutlak hassasiyeti ve diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında yüksek çözünürlüğü. Az miktarda numune yeterlidir. Bu yöntem, tüm oranları ayırmadan birlikte ölçen integral yöntemlere (örneğin ışık saçılımı) göre daha az yapaylık ve olası hata içerir. Bununla birlikte, ölçüm potansiyeli dikkate alınmalı ve süspansiyon/emülsiyon analizi için kararlı olmalıdır. Numune için uygun bir çöktürme sıvısı belirlenmelidir, burada ölçüm için bir yoğunluk gradyanı oluşturulabilir. Küçük tanecikli numuneler için ölçüm süresi uzundur. Değerlendirme için, taneciklerin yoğunluğu ve optik sabitleri bilinmelidir. Geniş bir dağılımda ince bir oranın değerlendirilmesi kritik olabilir.</p> <p>X-ışını algılaması kullanılırken, ölçüm aralığı malzemenin yoğunluğuna bağlıdır. Kalibrasyon, gradyan, Mie düzeltmesi veya optik bilgi gerektirmeden uygulama ve değerlendirme basittir. Yüksek bir dağılım spektrumu çözünürlüğü mümkündür ve sadece küçük bir miktar numune gereklidir. Bu yöntem, bir ölçüm etkinliğinde değerlendirilen 1010 tanecik ile iyi istatistikler sağlar. Bununla birlikte, ~% 5'e kadar seyreltme gereklidir ve değerlendirme için tanecik yoğunluğu bilinmelidir.</p>	<p>Bir sıvı içinde dağılmış tanecikli malzemeler</p> <p>Boyut aralığı: 0.1 - 5 µm</p>	<p>Tanecik boyutunun Stokes yasasına göre hesaplanabileceği çökme hızı (m/s).</p>
<p>Ultrasonik spektroskopisi (ISO/20998-1:2006 [43])</p> <p>Bir sıvı içinde dağılmış bir veya daha fazla malzeme fazının boyut dağılımının belirlenmesine izin verir. Hacimce % 0.1-50 arasında değişen dağılmış faz konsantrasyonları için ölçümler yapılabilir. Konsantre bir sistemde aglomerasyon veya topaklanma dahil olmak üzere boyut dağılımında dinamik değişikliklerin izlenmesini sağlar.</p> <p>Ancak bu yöntemin havaya ve sıcaklığa hassasiyeti vardır. Parametre ayarlaması karmaşıktır.</p>	<p>Kolloidlerdeki, dağılımlardaki ve emülsiyonlardaki tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: 10 nm - 3 mm</p>	<p>Kütle/sayıya bağlı tanecik boyutu dağılımının bir model (deneysel olabilir veya ilk ilkelere bağlı olabilir) aracılığıyla çıkarılabildiği azalma spektrumu</p>

<p>Ölçüm sonuçları farklı hacimlerin yüzdelere göre değişebilir.</p>		
<p>Küçük Açılı X-ışını Saçılması (SAXS) (ISO/TS 13762:2001 [44]) Ultra ince tozların ve süspansiyonların tanecik boyutu dağılımının belirlenmesine izin verir. Numunenin tanecik dağılımı gerekliliği, diğer yöntemler kadar katı değildir. SAXS, gözenekleri taneciklerden ayırt edemez ve bu nedenle gözenekli taneciklerden oluşan tozlar için kullanılamaz. Bu yöntem, taneciklerin izotropik ve küresel olarak şekillendirildiğini ve dolayısıyla karbon nanotüpler gibi küresel olmayan nano nesnelere sahip olmak üzere morfolojisi küresel olmaktan uzak tanecikler içeren tozlar için sınırlı uygulanabilirliğe sahiptir. Ek olarak, konsantre bir numuneye olan ihtiyaç nedeniyle tanecikler arasında bir girişim etkisi ortaya çıkabilir.</p>	<p>Toz ve süspansiyon formundaki tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: 1-300 nm</p>	<p>Bir difraktogramın matematiksel uyarlamasıyla tahmin edilen numune için ortalama tanecik boyutu</p>
<p>X-ışını kırınımı (XRD) (EN 13925-1 [45], EN 13925-2 [46] ve EN 13925-3 [47]) XRD, simüle edilmiş bir difraktogramın gerçek ölçüme matematiksel uyarlaması ile ortalama tanecik boyutunu tahmin eder. Kristalinitenin yüksek istatistiksel uygunluk ile ölçülmesini sağlar ve temsili numune alma ihtiyacını ortadan kaldırır. Mevcut fazların kristal yapıları, cihaz ve numuneye özgü parametreler bilinmelidir. Tanecik boyutunun kristalit boyutuna eşit olmadığına dikkat etmek önemlidir. Mikro gerilim, kafes kusurları ve sıcaklık faktörleri gibi diğer faktörler de tepe genişliğini etkileyebilir. Analiz için daha büyük kristalli numuneler (> 1 mg) gereklidir.</p>	<p>Tek kristalli veya çok kristalli malzemeler</p> <p>Kristalit boyut aralığı: ~ 1-100 nm</p>	<p>Bir difraktogramın matematiksel uyarlamasıyla tahmin edilen numune için ortalama tanecik boyutu.</p>
<p>Dinamik Işık Saçılımı (DLS) / Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) (ISO/22412:2008 [48]; ISO/13321:1996 [49]; ASTM E2490 - 09 [50]) Ortalama tanecik boyutunun hızlı ve basit bir şekilde tahmin edilmesini ve sıvılarda dağılan mikrometre altı taneciklerin veya damlacıkların boyut dağılımının genişliğinin ölçülmesini sağlar</p>	<p>Sıvılarda dağılmış tanecikler veya damlacıklar</p>	<p>Kütle/sayıya göre boyut dağılımı. Ortalama tanecik boyutu ve çoklu dağılım indeksi (birimsiz; boyut dağılımının genişliğinin ölçüsü).</p>

Süspansiyondaki nanotanecekler için DLS/PCS, boyut ve boyut dağılımının yerinde karakterizasyonunu sağlayan en yaygın kullanılan tekniklerden biridir ve zaman ile ortama göre tanecik süspansiyonu kararlılığının bir göstergesini sağlamak için genellikle zeta potansiyeli ölçümleriyle birlikte uygulanır. Yalnızca küçük bir miktar numuneye ihtiyaç vardır ve < 100 nm tanecik boyutu aralığında kırılma indislerine gerek yoktur. DLS/PCS, maruz kalma koşullarına daha doğru bir şekilde benzeyen çözeltilerde boyutu ölçtüğü için özellikle toksisite değerlendirmesinde kullanışlıdır. Yüksek konsantrasyonlu opak süspansiyonlar için bu tekniğin bir uzantısı, nanotanecek süspansiyonlarının tanecik boyutu ve kararlılığını sağlayan Çapraz Foton Korelasyon Spektroskopisi'dir (PCCS).

Bununla birlikte, kapsamlı numune seyreltmesi gereklidir. Bu yöntem, taneciklerin dağınık bir durumda muhafaza edilmesi zor olduğunda veya > 2 µm boyutundaki taneciklerin mevcut olduğu durumlarda sınırlı kullanıma sahiptir. Bu yöntemin sıcaklığa hassasiyeti vardır ve yalnızca düşük çözünürlüğü mümkün kılar. Veri analizi için optik parametrelerin bilinmesi gerekir ve bu yöntem farklı optik özelliklere sahip tanecikler için uygun değildir.

Dinamik Işık Saçılımının (DLS) tam bir tanecik boyutu dağılımı sağlamadığı belirtilmektedir. DLS, hidrodinamik çapın hesaplandığı Brownian hareketinin neden olduğu saçılmış ışığın yoğunluğundaki dalgalanmaları ölçerek, tanecik boyutu dağılımının tahmin edilmesini sağlar. Bu nedenle DLS, tanecik boyutu dağılımını doğrudan ölçmese bile bu yöntem, tam tanecik boyutu dağılımının tahmini için iyi bir temel sağlar. Yöntem ayrıca tanecik popülasyonunun çoklu dağılım indeksini gösteren bir sayı ("çoklu dağılım indeksi") sağlar. DLS verilerinden tanecik boyutu dağılımının hesaplanmasını kolaylaştıran birkaç yazılım vardır, ancak bu yazılımların yeterliliği ve karşılaştırılabilirliğinin daha fazla değerlendirilmesi gerekmektedir [51].

Boyut aralığı: 1 -
1000 nm

Tablo 2: Havada dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikleri oluşturma/numune alma yöntemleri

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralığı	MMAD
<p>Kademeli ayırıştırıcı</p> <p>Bir aerosolün (yani, bu bağlamda bir toz bulutu) boyut dağılımını elde etmek için kademeli ayırıştırıcılar kullanılabilir. Hava numuneleri, taneciklerin cam veya cam elyafı üzerinde biriktirildiği birkaç aşamadan oluşan bir cihaz aracılığıyla alınır. Tanecikler, boyutlarına bağlı olarak belirli bir aşamada etki edeceklerdir. Kesme boyutu, numune alımından önce ve sonra her aşamanın tartılmasıyla ve bu hesaplamalardan türetilen MMAD ile her aşamadaki jet hızlarından hesaplanabilir.</p> <p>Solunabilir veya içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını ölçmek için iyi kurulmuş bir tekniktir. Bununla birlikte, kademeli ayırıştırıcı aerodinamik kurallara uymadığı zaman yüksek en-boy oranına sahip nanotaneciklerin boyutunu tanımlayamayabilir [52]. Normal kademeli ayırıştırıcılar, ~ 250 nm'den daha büyük taneciklerin yakalanmasıyla sınırlı boyut seçici aşamalara sahip olacaktır. Bu bir numune alma yöntemidir ve ayrıca aerosol haline getirmeyi gerektirir.</p> <p>ISO/TR 27628:2007 [33] bilgilendirici bir açıklama sağlar.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: 0.1-20 µm ve 0.5-80 µm</p>	<p>MMAD, uygun bağlı bir analitik teknikle belirlenebilir.</p>
<p>Düşük Basınçlı Ayırıştırıcı (ELPI)</p> <p>ELPI, çapı 7 nm'den büyük tanecikler için gerçek zamanlıya yakın aerosol boyutu dağılımları sağlamak amacıyla atalet toplama ile elektrikli tanecik tespitini birleştiren bir tür kademeli ayırıştırıcıdır. Aerosol tanecikleri, kademeli bir ayırıştırıcı ile numune almadan önce tek kutuplu bir iyon yükü cihazında yüklenir. Cihazın üst boyut sınırı 10 µm'dir, ancak pratikte daha büyük tanecik boyutlarında önemli kayıplar nedeniyle yalnızca yaklaşık 2.5 µm'ye kadar güvenilir veriler elde edilebilir. Toplanan aerosol parçacıkları çevrimdışı analiz için kullanılabilir, ancak bu aynı zamanda doğrudan ölçüm sağlamadığından bir sınırlamadır. Bununla birlikte, elektron mikroskobu ve kimyasal türleşme dahil olmak üzere, numunelerle kullanılacak bir dizi çevrimdışı analitik yöntem sağlar. ELPI, maruz kalma tahmini ile ilgili olarak faydalı bir uygulamaya sahiptir.</p> <p>En düşük aşamadaki veriler, gerçek boyuttaki kanal genişliğindeki kayıplar ve belirsizlikler nedeniyle nispeten büyük belirsizliğe sahiptir.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: 7 nm - 10 µm</p>	<p>MMAD, uygun bağlı bir analitik teknikle veya hesaplamayla belirlenebilir.</p>

ISO/TR 27628:2007 [33] bilgilendirici bir açıklama sağlar.		
<p>Döner tambur yöntemi (EN 15051-2) [53]</p> <p>Bu yöntem, dönen bir tamburdaki bir malzemenin tekrarlı şekilde kaldırılması ve düşürülmesi ile üretilen havada asılı bir toz bulutunun boyut seçici şekilde numune alımına dayanır. Tamburdan çekilen hava, özel olarak tasarlanmış bir çıkış ve iki gözenekli poliüretan köpük ve bir membran filtreden oluşan 3 aşamalı bir bölümlendirme sisteminden geçer. Her toplama aşamasında toplanan toz kütlesi, biyolojik olarak ilgili boyut oranlarının doğrudan bir ölçüsünü vermek için gravimetrik olarak belirlenir. Bu yöntem, endüstrideki çok çeşitli malzeme işleme süreçlerini taklit eder ve havada taşınan bir malzemenin biyolojik olarak ilgili boyut işlevlerini belirler. Toz toplama aşamalarındaki içerikler analiz edilerek tam boyutlu dağılımlar elde edilebilir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir veya içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygundur. Döner tambur tozluluk testleri genellikle üç tekrarlı test olarak gerçekleştirilir ve oldukça büyük miktarlarda, tipik olarak 300-600 g test malzemesi gerektirir. Bu kadar büyük miktarlardaki test malzemesinin, çok toksik ve/veya maliyetli malzemelerin test edilmesi durumunda pratik olmayabileceği ve çok daha az miktarda malzeme kullanılarak kontrollü atmosferik ortamlarda çalıştırılabilen test sistemlerine ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır [54].</p>	<p>Kuru tozlar/granüller/ufalanabilir ürünler</p> <p>Boyut aralığı: 0.5 - 10.000 µm</p>	<p>MMAD, uygun bağlı bir analitik teknikle belirlenebilir.</p>

<p>Sürekli damlatma yöntemi (EN 15051-3) [55]</p> <p>Bu yöntem, yavaş bir dikey hava akımında malzemenin sürekli olarak tekli damlatılmasıyla üretilen havada asılı toz bulutunun boyut seçici şekilde numune alımına dayanmaktadır. Malzemenin damlatılmasıyla açığa çıkan toz, hava akımı tarafından içe çekilebilir ve solunabilir kısımlara ayrıldığı bir numune alma bölümüne iletilir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir veya içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygundur. Sürekli tek damlatma yöntemi, gerekli beş ayrı test çalışması için toplam 500 g miktar gerektirir. Bu kadar büyük miktarlardaki test malzemesinin, çok toksik ve/veya maliyetli malzemelerin test edilmesi durumunda pratik olmayabileceği ve çok daha az miktarda malzeme kullanılarak kontrollü atmosferik ortamlarda çalıştırılabilen test sistemlerine ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır [54].</p>	<p>Kuru tozlar/granüller /ufalanabilir ürünler</p> <p>Boyut aralığı: 0.5-10.000 µm</p>	<p>MMAD, uygun bağlı bir analitik teknikle belirlenebilir.</p>
---	--	--

Tablo 3: Yalnızca içe çekilebilir oranları ölçen veya ayrıntılı dağılımlar vermeyen yöntemler

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralık	Veri türü
<p>Yıkayarak ayırma (Elütriasyon)</p> <p>Tanecikler, değişen hızlarda bir kolon üzerine çekilir. Hız, tanecik boyutunu hesaplamak için kullanılır ve geriye kalan numunenin belirli bir hızdaki ağırlığı, dağılımı hesaplamak için kullanılır. Yöntem, > 15 mikron taneciklerle sınırlıdır.</p> <p>Yöntem, solunabilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun değildir, ancak içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Kuru tozlar/granüller</p> <p>Boyut aralığı: 15-115 mikron</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
<p>Hava jetli elek</p> <p>Hava, ince bir elek üzerinde ağırlıklı bir numuneden aspire edilir ve ağırlık kaybı ölçülür. Yöntem, incelenen malzemenin yüzdürülemeyen oranını tahmin edebilmektedir. Taneciklerin agregasyonu, güvenilir değerlere neden olacaktır. Ayrıca, tespit alt sınırı sadece 10 mikron olduğundan, bu yöntem solunabilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun değildir.</p> <p>Yöntem, solunabilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun değildir, ancak içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygun olabilir.</p>	<p>Her çeşit tanecik</p> <p>Boyut aralığı: 10-10.000 mikron</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
<p>Siklonlar</p>		

<p>Siklon kullanımı, 4.25 ve 100 mikronda siklon kesme noktalarının oluşturulmasıyla test atmosferlerinde solunabilir ve/veya içe çekilebilir taneciklerin mevcut olup olmadığını belirlemeye yönelik basit bir yaklaşımdır. Siklondan geçen taneciklerin ağırlığı ölçülerek, 10 mikrondan küçük taneciklerin boyut dağılımını belirlemek için daha karmaşık yöntemlerin uygulanmasının gerekip gerekmediğine karar verilebilir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin oranını belirlemek için uygundur.</p>	<p>Her çeşit tanecik Boyut aralığı: 0.1-200 mikron</p>	<p>MMAD belirlenemez.</p>
--	--	-------------------------------

Tablo 4: Havada dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikleri ölçme yöntemleri

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralığı	Veri türü
<p>Taramalı Mobil Tanecik Boyutlandırıcı (SMPS) (ISO 15900:2009 [56]; ISO 10808:2010 [5]; ISO 28439:2011 [57])</p> <p>SMPS, tanecikleri yükleyerek ve elektrotlar arasında geçerken hareketliliklerine göre parçalara ayırarak çalışır. Bu yöntem, Diferansiyel Hareketlilik Analizörü (DMA) ve Optik Tanecik Sayacı'nı (OPC) birleştirir. SMPS, nanotanecikleri algılar, sayar, tanecik boyutu dağılımının ölçülmesini sağlar ve nano aerosollerin medyan çapını 108 tanecik/cm³'e kadar sayar. Bu yöntem ayrıca, soluma toksisitesi testi sonuçlarının etkili analizini desteklemek için nanotaneciğin yüzey alanının, kütle dozunun, bileşiminin ve dağılımının değerlendirilmesine izin verir. SMPS, maruz kalma tahmini ile ilgili olarak faydalı bir uygulamaya sahiptir.</p> <p>SMPS ile ölçüm, 100 nm'nin altındaki boyut aralığında aşağıdaki gerekliliklerin tümünü karşılayan ve şu anda mevcut olan tek yöntemdir: i) tanecik boyutu dağılımının kararlılığını kontrol etmek için uygun zaman çözünürlüğü ile taneciğe sürekli maruz kalmalar sırasında tanecik boyutu dağılımının ölçülmesi ve konsantrasyon; ii) tanecik boyutları ve konsantrasyonlarının ölçüm aralığı, toksisite testi sırasında test sistemine maruz bırakılan nanotanecik aerosollerinin ölçüm aralığını kapsar; iii) tanecik boyutu ve konsantrasyon ölçümleri, nanotanecik toksisitesi testi için yeterince doğrudur ve uygun referans standartlarına göre kalibrasyon gibi yollarla doğrulanabilir; iv) tanecik boyutlandırmasının çözünürlüğü, sayı ağırlıklı dağılımın yüzey alanı veya hacim ağırlıklı dağılım dönüşümüne izin verecek kadar doğrudur.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: ~ 3-800 nm -115 mikron</p>	<p>Sayıya göre boyut dağılımı (boyut aralığı başına sayı). MMAD, parçacık yoğunluğu bilgisi ile dağılımdan hesaplanabilir.</p>

<p>Bununla birlikte, SMPS nispeten yavaştır ve seri olarak farklı boyut aralıklarını ölçmek için bir tarama yaklaşımı gerektirir. Bu yöntem, 35 °C'nin altındaki ortam sıcaklıklarıyla sınırlıdır (CPC'de bütanolün buharlaşması nedeniyle) ve numunenin aerosol haline getirilmesini gerektirir. SMPS, aglomeratlar ve birincil tanecikler arasında ayırım yapamaz. Küresel olmayan tanecikler için (örneğin HARN), çapın ve kütle konsantrasyonunun SMPS ile tahmin edilmesi önemli hatalara neden olabilir. Tanecik boyutu dağılımının tam bir resmini sağlamak için SPMS ve OPC'den alınan ölçüm verilerinin bir araya getirilmesi, iki yöntemin uyguladığı farklı ilkeler nedeniyle uygun değildir [52]. Kaynağın kararlılığını bilmek önemlidir, çünkü boyut dağılımı, tanecik konsantrasyonu veya her ikisindeki hızlı değişiklikler boyut dağılımının ölçümünü etkileyebilir. Bu, atmosferde toplanma eğilimi yüksek olan nanomalzemeler için dikkate alınması gereken bir konudur.</p>		
<p>Hızlı Hareketlilik Tanecik Boyutlandırıcı (FMPS)</p> <p>FMPS, mikrometre altı aerosol taneciklerinin boyut dağılımının 107 tanecik/cm³'e kadar (tanecik boyutuna bağlı olarak) belirlenmesini sağlar. Tanecik boyutu dağılımlarının gerçek zamanlı olarak görselleştirilmesini sağlayan, bir saniyelik veya daha kısa bir zaman çözünürlüğü ile ölçümler yapılabilir. Bununla birlikte, FMPS tipik olarak düşük tanecik konsantrasyonlarında SMPS'den daha az hassastır.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler Boyut aralığı: ~ 5-560 nm</p>	<p>Sayıya göre boyut dağılımı (boyut aralığı başına sayı). MMAD, tanecik yoğunluğu bilgisi ile dağılımdan hesaplanabilir.</p>
<p>Difüzyon hücreleri</p> <p>Difüzyon hücrelerinin çalışması, aerosol taneciklerinin Brownian hareketine dayanır. Difüzyon yoluyla birikim kayıpları, tanecik çapının bir fonksiyonudur. Farklı geometrilere sahip sistemler aracılığıyla difüzyon bazlı biriktirme hızlarını ölçerek, tanecik boyutu dağılımını belirlemek mümkündür. Biriktirme sistemleri genellikle bir difüzyon hücresi oluşturmak için seri halinde birlikte yerleştirilir. Difüzyon hücresi, cihaz kurulumuna bağlı olarak 2 nm'ye kadar düşük tanecik boyutlarının belirlenmesi için tasarlanabilir. Bu yöntem, maruz kalma tahmini ile ilgili olarak yararlı bir uygulamaya sahiptir.</p> <p>Ölçülen birincil özellik, taneciklerin difüzyon katsayısıdır ve bu, tanecik çapına dönüştürülmelidir. Her difüzyon aşamasından önce ve sonra sayı konsantrasyonunu belirlemek için cihazın bir tanecik sayacı (tipik olarak sürekli akışlı Yoğunlaşma Tanecik Sayacı) ile çalıştırılması gerekir. Ham verilerin gerçek boyut dağılımına dönüştürülmesi karmaşıktır ve denklemlerin çözümleri, çoklu dağılımlı aerosol boyutu dağılımları durumunda kesin sonuçlar vermez.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler Boyut aralığı: 0.005 – 0.1 µm</p>	<p>Ortalama difüzyon çapının tanecik yoğunluğu bilgisi ile belirlenebileceği difüzyon çapına göre aralıklarla tanecik sayısı.</p>

<p>ISO/TR 27628:2007 [33], bu yöntemin bilgilendirici bir açıklamasını sağlar.</p>		
<p>Optik Tanecik Sayacı (OPC)</p> <p>OPC, aerosol haline getirilmiş tanecikleri tespit etmek ve saymak için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve geniş bir sıcaklık aralığında (0 - 120 °C) çalışır. Birincil tanecik aglomeralarının/agregalarının ölçülmesini ve sayılmasını sağlar. OPC, maruz kalma tahmini ile ilgili olarak faydalı bir uygulamaya sahiptir.</p> <p>Bununla birlikte, OPC'nin çap olarak yaklaşık 100-300 nm'den küçük taneciklere hassasiyeti vardır ve potansiyel birincil tanecik için yetersiz kapsama sağlar. Tanecik boyutu dağılımının tam bir resmini sağlamak için SPMS ve OPC'den alınan ölçüm verilerinin bir araya getirilmesi, iki yöntemin uyguladığı farklı ilkeler nedeniyle uygun değildir [52].</p> <p>ISO/TR 27628:2007 [33], bu yöntemin bilgilendirici bir açıklamasını sağlar.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler Boyut aralığı: 0.3 – 17 µm</p>	<p>Tanecik sayısı konsantrasyonu</p>
<p>Lazer saçılımı/kırınımı</p> <p>Genel olarak, gelen ışığın saçılması, bir detektör tarafından ölçülen belirgin bir model verir. Bu teknik, tanecik özelliğine bağlıdır - yani, malzemenin, aynı zamanda tanecik boyutuna da bağlı olan benzersiz saçılma ve kırınım özellikleri vardır. Cihazı benzer bir malzemeye (ölçülecek malzeme ile aynı boyut aralığında) kalibre etmek önemlidir. Lazer saçılma teknikleri, geometrik parçacıklar, yani küreler, küpler ve monokristaller için uygundur. Tanecik boyutu optik olarak oluşturulacaktır. MMAD, bir hesaplama düzeltmesi yoluyla hesaplanabilir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir boyuttaki taneciklerin dağılımını belirlemek için uygundur. Lazer kırınımı, küresel bir taneciğin şeklini alır. Bu nedenle test ürünleri, küresel olmayan tanecikler için 1:3'lük bir kısıtlama ile yüksek en boy oranlarına sahip olmamalıdır. Bu yöntem, 100 nm'nin altındaki aralıkta gerçekten uygun sınırlı uygulanabilirliğe sahiptir. Birkaç mikronun altındaki aralıkta, sonuçlar büyük ölçüde taneciklerin optik sabitlerine bağlıdır.</p>	<p>Her çeşit tanecik Boyut aralığı: 0.06-100 µm</p>	<p>Tanecik yoğunluğu bilgisi ile kütle medyan çapının hesaplanabileceği tanecik boyutu/boyut dağılımı*.</p>
<p>Işık dağıtımli aerosol spektrometresi (LSAS)</p> <p>LSAS, bir gazda asılı taneciklerin boyutunu, sayı konsantrasyonunu ve sayı/boyut dağılımını ölçmek için uygulanabilen bir tür ışık dağıtımli aracıdır. LSAS, 1011 tanecik/m³'e kadar nispeten yüksek konsantrasyonlarda tanecik boyutu dağılımının ve tanecik sayısı konsantrasyonunun belirlenmesi için kullanılabilir. LSAS'ın geniş ölçüm aralığı, nano ölçekli ölçümlerde yüksek belirsizliğe neden olabilir.</p>	<p>Aerosol içindeki tanecikler Boyut aralığı: 0.06 - 45 µm</p>	<p>Tanecik yoğunluğu bilgisi ile kütle medyan çapının hesaplanabileceği tanecik boyutu/boyut dağılımı*.</p>

<p>Ölçümler, taneciklerin yansıtabilirliğine bağlı olabilir. Lazer kırınımı, küresel bir taneciğin şeklini alır. Bu nedenle test ürünleri, küresel olmayan tanecikler için 1:3'lük bir kısıtlama ile yüksek en boy oranlarına sahip olmamalıdır. Bu yöntem, 100 nm'nin altındaki aralıkta gerçekten uygun sınırlı uygulanabilirliğe sahiptir. Birkaç mikronun altındaki aralıkta, sonuçlar büyük ölçüde taneciklerin optik sabitlerine bağlıdır.</p>		
--	--	--

Tablo 1 - 4'te listelenen yöntemler kullanılarak, aşağıdaki bilgiler (uygun olduğu şekilde) sunulmalıdır:

- Numune hazırlama yöntemleri ve kullanılan analiz yöntemleri
- Lot numarası, numune numarası
- Süspansiyon ortamı, sıcaklık, pH
- Konsantrasyon (taneciklerle veya liflerle ilgili)
- Mikroskopiden temsili görüntüler
- Uygulanan ölçüm tekniğinden tanecik boyutu dağılımı histogramı
 - Uygun şekilde birim hacim başına kütle numarası ve yüzey alanı olarak dağılımdaki çözünür zirveler için ortalama tanecik boyutu/boyutları
 - Gelecekte rapor edilen değerlerde beklenen değişim yüzdesi (ör. üretim serileri arasındaki çeşitlilikler)
- Tüm Standartlar referansı (örn. ISO) ve referans malzemeler

Histogramlarda, yoğunluk dağılımlarında ve kümülatif dağılımlarda tanecik boyutu analizi verilerinin grafiksel gösterimi için gerekli kurallar ISO 9276 1:1998'de [58] belirtilmiştir. Ayrıca, ölçülen verilerden yukarıda bahsedilen dağılımların elde edilebilmesi için izlenecek standart bir isimlendirme belirler. Tanecik boyutu analizi verilerinin grafiksel bir temsilde, bağımsız değişken, yani taneciklerin boyutunu karakterize etmek için seçilen fiziksel özellik, apsis (x eksen) üzerine çizilir. Miktarın ölçüsünü ve türünü (örneğin sayı, kütle) karakterize eden bağımlı değişken, ordinata (y eksen) çizilir. ISO 9276-2:2001 [59], belirli bir tanecik boyutu dağılımından ortalama tanecik boyutlarının veya ortalama tanecik çaplarının ve aralıklarının hesaplanması için ilgili denklemleri sağlar. Boyut dağılımının histogram olarak mevcut olduğu varsayılmaktadır. Bununla birlikte, tanecik boyutu dağılımı bir analitik fonksiyonla temsil edildiğinde aynı matematiksel işlemin uygulanması da mümkündür. Ayrıca, ISO 9276-2:2001 [59]'te herhangi bir başka şekle sahip bir taneciğin tanecik boyutunun ilgili tanecik ile aynı hacme sahip eşdeğer bir kürenin çapı ile de temsil edilebileceği varsayılmaktadır.

Malzemelerin tanecikli aerosol üretme eğilimi (malzemenin tozluluğu dahil) hakkında doğru bilgiye sahip olmak avantajlıdır. Endüstride kullanılan çeşitli işleme ve kullanma türlerini temsil eden ve tekrarlayan tek bir tozluluk testi yöntemi yoktur. Tozluluk ölçümü, kullanılan test cihazına, tozun özelliklerine ve çeşitli çevresel değişkenlere bağlıdır. Ölçülen tozluluk, miligram cinsinden tozluluk testi prosedürü tarafından üretilen solunabilir tozun, test için kullanılan test malzemesinin test kütlesine kilogram cinsinden oranıdır. EN 481'de tanımlanan biyolojik olarak ilgili aerosol oranlarına göre yığın (nano ölçekli olmayan) malzemelerin tozluluğunu ölçmek için bir dizi yöntem vardır. İki yöntem (döner tambur yöntemi ve sürekli damlatma yöntemi) EN 15051 "İşyeri atmosferleri - Yığın malzemelerin tozluluğunun ölçülmesi - Gereklilikler ve referans test yöntemleri" [60] belgesinde ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Tozluluk göreceli bir terimdir (standart bir test prosedürü sırasında yayılan toz miktarından türetilmiştir). Bu, seçilen yöntem, test edilen yığın malzemenin durumuna ve özelliklerine ve testlerin gerçekleştirildiği çeşitli çevresel değişkenlere bağlıdır. Bu nedenle, EN 15051'deki iki yöntem farklı sonuçlar sağlayabilir (yöntemler, kullanım süreçlerini temsil etmeyi amaçlamaktadır).

Bir toz bulutunun tanecik boyutu dağılımı, toz kaynağından farklı olabilir. Serbest düşen tozlar tarafından toz oluşumu üzerine yapılan çalışmalar, ortaya çıkan maruz kalma açısından tozun işlenme şeklinin malzemenin toz üretme kapasitesi kadar önemli olabileceğini göstermiştir. Düşme yüksekliği, birden fazla nedenden dolayı toz oluşumu ve salımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Etki ne kadar yüksek olursa, o kadar fazla toz yayılır. Ayrıca, düşme yüksekliği ne kadar büyükse, tozun yayılmasını kolaylaştıran sürüklenmiş hava akışı o kadar büyük olur.

Bu, süreç tasarımının ve yeterli çalışma uygulamalarının önemini gösterir.

Malzeme akışı üzerine, çeşitli faktörlerin etkisinin çok açık olmadığını gösteren birçok ilginç çalışma yapılmıştır. Örneğin, bazen hatalı olarak, daha büyük oranda iri tanecik içeren toz halindeki bir malzemenin daha az toz zararlılığına neden olduğu varsayılır; bununla birlikte, malzemede daha yüksek bir iri tanecik oranı, *iri taneciklerin oranındaki artış ile malzemenin kohezyonunda bir azalmanın meydana gelmesi* [61] ve ince taneciklerin büyük tanecikler ile daha çok çarpışması sonucunda bu taneciklerin karışması sebebiyle tozluluğu artırabilir. Tanecikler arasındaki etki ne kadar yüksekse, toz o kadar fazla yayılır.

Tablo 2'deki aerosol haline getirme/numune alma yöntemleri, solunabilir taneciklerin dağılımının ve (daha az ölçüde) içe çekilebilir taneciklerin dağılımının belirlenmesinde kullanılır. Bu yöntemler aerosol test atmosferlerini oluşturur ve eşleştirilmiş tanecik belirleme cihazlarını gerektirir.

Tablo 4'teki tanecik belirleme yöntemleri, aerosol haline getirilmiş taneciklerin dağılımını karakterize etmek için kullanılabilir. Bu yöntemler, havadaki tanecikleri ve dolayısıyla kütle medyan aerodinamik çapı (MMAD) ile geometrik standart sapmayı (GSS) ölçtüğü için tercih edilir, ancak sınırlamalara tabidir. Tüm tanecik boyutu cihazları, çalışma prensibi ile sınırlı tanecik boyutu aralıklarına sahiptir. Bu nedenle, örtüşen boyut aralıklarıyla birlikte sıklıkla birden fazla cihaz türü kullanılır. Genellikle malzemeye bağlı olarak, bu boyut dağılımları tam olarak eşleşmeyebilir, çünkü farklı ölçüm ilkeleri farklı eşdeğer çaplar sağlar. Ayrıca, tüplerdeki veya cihazların girişindeki difüzyon kayıpları nedeniyle 1 nm - 3 nm arasındaki düşük boyutlar aerosol ölçümü cihazında doğru bir şekilde ölçülemez. Sayıya bağlı tanecik boyutu dağılımına göre tanecik sayısı konsantrasyonu çok düşük olarak belirlenecek, farklı ve geçerli alt boyut sınırına sahip tanecik sayaçları farklı tanecik sayısı konsantrasyonlarını verecektir. Maddelerin tanecik boyutu dağılımının karakterizasyonu için aerosol haline getirilmesi, mühendislik kurulumunun çalışma koşullarının (örneğin akış hızı ve çıkış deliği) bir sonucu olarak aerosol boyutuna bir üst sınır getirmesi durumunda da yapaylık derecesi ile sonuçlanır. Üst boyut sınırı Stoke denklemi kullanılarak tahmin edilebilir. Yalnızca solunabilir oranları ölçen veya ayrıntılı dağılımlar vermeyen diğer yöntemler Tablo 3'te detaylandırılmıştır.

Granülometri ile ilgili yayınlanmış veriler

Tanecik boyutu ölçümleri, meslektaş incelemesinden geçmiş literatürde yayınlanmıştır. Tanecik boyutu verilerine özgü hiçbir elektronik veritabanı yayın sırasında bulunamamıştır.

(R.7.1.14.2'nin sonu)

Granülometri ile ilgili mevcut bilgilerin değerlendirilmesiyle ilgili olarak (Bölüm R.7.1.14.3), sadece araştırılan malzemenin değil, aynı zamanda uygun olan yerlerde havadaki tozun da tanecik boyutu karakterizasyonunun yapılması tavsiye edilir. Gerçek tanecik boyutu dağılımının, kullanılan endüstriyel işleme yöntemlerine büyük ölçüde bağımlı olduğunu ve ölçüm ile değerlendirme faaliyetinin, sonraki çevresel veya insan dönüşümlerinden kaynaklanan tanecik boyutu dağılımındaki herhangi bir değişikliği dikkate almasını sağlamak için özen gösterilmesi gerektiğini hatırlamak da önemlidir.

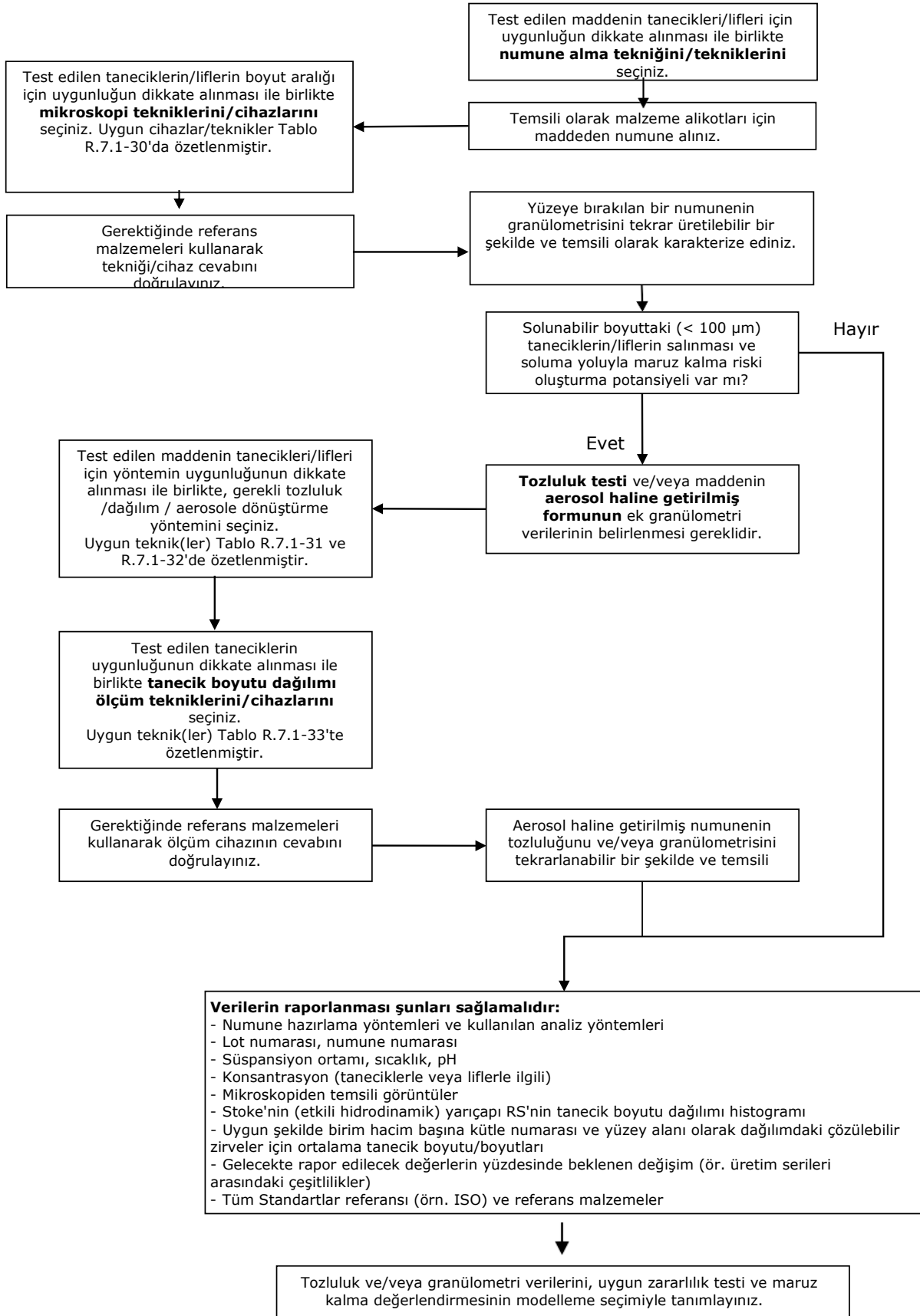
Granülometri üzerindeki belirsizlik göz önüne alındığında, mühendislik kurulumunun operasyonel koşulların (örn. akış hızı ve çıkış açıklığı) bir sonucu olarak aerosol boyutuna bir üst sınır getirmesi durumunda tanecik boyutu dağılımı karakterizasyonu için maddelerin aerosol haline getirilmesinin bir yapaylık derecesi ile sonuçlandığına dikkat edilmelidir. Üst boyut sınırı Stoke denklemi kullanılarak tahmin edilebilir.

Granülometri hakkında bir sonuca varmak için (Bkz. Bölüm R.7.1.14.4), taneciklerin işyerine veya çevreye potansiyel salımının birçok endüstriyel sürecin tasarımı ile işletiminde ve maddelerin güvenli bir şekilde elleçlenmesinde önemli bir husus olduğu dikkate alınmalıdır.

Taneciklerin salımı, bir güvenlik zararlılığı oluşturabilir, insanlar üzerinde olumsuz sağlık etkilerine neden olabilir ve çevreyi etkileyebilir. Bu nedenle, risklerin değerlendirilmesine, kontrol edilmesine ve en aza indirilmesine olanak tanıyacak şekilde maddelerin tanecik veya lif olarak salım eğilimi hakkında veri elde etmek önemlidir. Toz halindeki maddelerden tanecik salımının ölçümü, bir tozun tozluluğunun normal ölçümüne benzerlik gösterir, ancak farklı tanecik boyutu aralıklarına uygun yöntem ve cihazlandırmalarda anlamlı farklılıklar vardır.

Ek olarak, akut toksisite için hangi uygulama yolunun en uygun olduğuna karar vermek ve doz toksisitesi hayvan çalışmalarının tekrarlanması için tanecik boyutu dağılımına ihtiyaç vardır. Tanecik boyutu oranlarını belirlemek amacıyla daha sonra işyerinde havadaki taneciklerin solunmasından kaynaklanan olası sağlık etkilerini değerlendirmek için kullanılan bir dizi yöntem sağlanmıştır. Farklı tanecik boyutu aralıklarını kapsayan bir dizi yöntem mevcuttur ancak bunların hiçbiri tüm boyut aralığı için geçerli değildir. Tanecik özelliklerinin tam olarak anlaşılmasını formüle edebilmek için mümkün olan yerlerde birden fazla teknik kullanılmalıdır ve gerekli olan optimum teknikler seti, araştırılan belirli madde ve biçime göre seçilmelidir.

Son olarak, granülometri için bütünleşik test stratejisini (BTS) göz önünde bulundurarak önceki tavsiyeleri dikkate almak, iş akışında gösterildiği gibi olacaktır:



Şekil 1: Granulometri için Bütünleşik Test Stratejisi (BTS)

2.2.3.3 Şekil için öneriler

R.7.1.19 ŞEKİL

Özdeş bileşime sahip katı tanecikler/granüller, farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olabilen küreler, çubuklar, tüpler, lifler ve plakalar dahil olmak üzere çeşitli iyi veya kötü tanımlanmış şekillere sahip olabilir. Şekiller, boşlukların birbirine bağlanması yolu ile belirlenir ve tanecikler, serbest enerjiyi en aza indiren ve belirli çevresel koşullar altında kinetik olarak elde edilebilen şekli alır. Tanecik şekli, biyolojik ortamdaki birikim, yüzeye tutunma kinetiği ve zararlılık değerlendirmesinin değerlendirilmesi için bağlamsal değeri olan bazı nanotaneciklerin karakterizasyonunda önemli bir parametredir.

Yüksek en-boy oranına sahip taneciklerin bilgisi, bazı toksisite testi sonuçlarının yorumlanmasına yardımcı olabilir.

Şekil tanımı

Şekil, incelenen malzemeyi oluşturan tanecik veya tanecik koleksiyonlarının sonlanma noktalarının, bunların aglomeralarının veya agregalarının niteliksel veya en iyi ihtimalle yarı niceliksel geometrik tanımı veya ölçüsüz bir terimidir ([6'dan uyarlanmıştır]).

Tanecikler; küreler, çubuklar veya tanımlanmış kristal morfolojileri gibi kolaylıkla tanımlanabilir şekillere sahip olabilir. Tanecik şekli çok daha değişkendir ve şekli karakterize etmek için küresellik, dairesellik, en-boy oranı, dışbükeylik ve oransal kırılma boyutu gibi "şekil faktörleri" gereklidir.

ISO 9276-6:2008 [62], tanecik şeklinin ve morfolojisinin tanımı ile nicel temsili için kuralları ve terminolojiyi belirtir. Karşılık gelen üç şekil seviyesi ayırt edilebilir: makro şekil, mezo şekil ve mikro şekil.

Makro tanımlama, taneciğin geometrik oranları açısından genel biçiminin bir açıklamasıdır. Genel olarak taneciğin gölgesi üzerinde yapılan boyut ölçümlerinden hesaplanan basit geometrik tanımlayıcılar kullanılır. Düşük sıralı Fourier tanımlayıcıları, makro tanımlayıcılar olarak da kabul edilebilir.

Mezo tanımı, Barrett'in yuvarlaklığı ve içbükeyliği gibi, tanecik oranlarından çok daha küçük olmayan bir boyut aralığında olan tanecik şekli ve/veya yüzey yapısının ayrıntıları hakkında bilgi sağlar [63].

Aşağıdaki *mezo tanımlayıcılar* tanımlanabilir:

- a) morfolojik matematiksel tanımlayıcılar, hesaplama kapsamı ve en büyük içbükeylik indeksi;
- b) içbükeylik organizasyonu ve karmaşıklığı hakkında genel bir fikir veren bir içbükeylik şeması
- c) sınırın aşınma sürecinde aktif olan kısımları belirleyen açısallık tanımlayıcıları:
 - i. başka bir tanecikle temas edecek noktalar olan, dışbükeylik gövdesinin köşelerindeki tepe noktalarının seçildiği bir açısallık faktörü,
 - ii. taneciğin ağırlık merkezi üzerinde ortalanmış taneciğin alanına eşit alana sahip bir dairenin dışındaki eklemeleri (spike) dikkate alan ikinci dereceden bir ekleme (spike) parametresi,
 - iii. kayma kirişi, kesme kenarlarının sayısı ve bunların kristal yüzeyinin dalga formundaki keskinliği hakkında bilgi üretir;
- d) oransal boyut, daha büyük bir ölçüm adımı dikkate alınarak genel yapısal karmaşıklık hakkında veri sağlar;
- e) morfolojinin daha küçük ölçekli bileşenlerini belirten, makro tanımlayıcılardan daha yüksek dereceli Fourier tanımlayıcıları;

f) bükülme enerjisi, kontur çizgilerinin genel karmaşıklığını ölçme.

Mikro tanım, yukarıda belirtilen tanımlayıcılardan ikisini kullanarak şeklin sınırlarının sertliğini belirler:

- yapısal açıklama için kullanılan daha küçük bir ölçüm adımının kullanılması sonucunda ölçülen oransal kırılma boyutu;
- yüzey-doku analizi için yüksek dereceli Fourier tanımlayıcıları/katsayıları.

R.7.1.19.1 Şekil üzerine bilgi gereklilikleri

Madde katı olmayan veya granüler formda piyasaya arz edildiyse ya da kullanıldıysa çalışmanın gerçekleştirilmesi gerekmez. Şeklin belirlenmesi, suda çözünürlük hakkında bilgi gerektirir. Lif uzunluğu ve çap dağılımı, ürünün lifli yapısı ve lifli şeklin elektron mikroskobu koşulları altındaki kararlığı hakkında bilgi gerektirir.

Özet, taneciğin mikroskobik bir görüntüsünü ve taneciğin sonlanma noktalarının ve/veya incelenen malzemeyi oluşturan taneciklerin, kümelerin veya kümeler koleksiyonlarının niteliksel veya yarı niceliksel bir geometrik tanımını içermelidir. Boyuttan bağımsız makro, mikro ve mezo şekilli tanımlayıcılar (örnekler, farklı yönlerdeki uzantı oranlarıdır; en boy oranı veya oransal kırılma boyutu gibi birim [metre/metre] mevcuttur (ISO 9276-6:2008 [62]) ve mümkün olan her yerde kullanılmalıdır. Şekli tanımlamak için terimlerin ve/veya ölçülen büyüklüklerin bir kombinasyonuna ihtiyaç duyulabilir; bu, malzemelerin aynı anda farklı zararlılık potansiyellerini sunabilen bir numunede birden çok şekil gösterebildiği halihazırda öngörülebilir zorlukların üstesinden gelmek için gereklidir. Ayrıca ölçümlerin yapıldığı sıcaklık, kullanılan numunenin saflığı, fiziksel durumu, kullanılan yöntem ve kullanılan referans madde (varsa) hakkında bilgi de dahil edilmelidir.

Bir yöntemde kullanılan inceleme düzeyi, yöntemin sınıflandırılması için çok pratik bir kriterdir, çünkü birçok yöntem farklı boyut düzeylerinde şekil bilgisi sağlar. Yöntemleri sınıflandırmanın bir başka uygun yolu, şekil tanımlayıcılarını tanecik görüntülerinden türetenler ile fiziksel özelliklerden şekil tanımlayıcıları türetenler arasında ayırım yapmaktır:

a) Geometrik tanımlayıcı/şekil faktörlerinin hesaplanması:

Geometrik şekilli faktörler, iki farklı geometrik özellik arasındaki oranlardır; bu tür özellikler, genellikle tüm taneciğin görüntüsünün oranlarının bir ölçüsü veya taneciği saran ideal geometrik bir cismin oranlarının ölçüsüdür. Bu sonuçlar, en boy oranına benzer makro şekilli tanımlayıcılardır.

b) Fiziksel eşdeğer çaplardan dinamik şekilli faktörlerin hesaplanması:

Bu şekilli faktörler, karşılaştırmada en az bir fiziksel özelliğin dikkate alınması dışında geometrik şekilli faktörlere benzer. Genellikle, sonuçlar eşdeğer çapların oranı olarak ifade edilir, örneğin hacim - eşdeğere çapa Stokes çöktürme hızı x_{Stokes} / x_v olarak ifade edilir.

c) Morfolojik analiz:

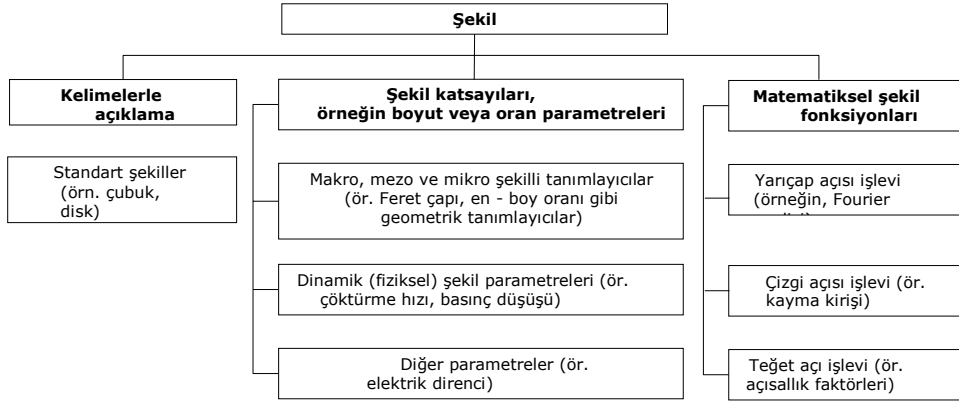
Morfolojik analiz tanımlayıcıları, tüm taneciğin oranlarından çok daha küçük olmayan ortalama tanecik şekli değerleri verir. Tipik bir örnek içbükeylik analizidir.

d) Kontur çizgisinin analizi (şeklin sınırı):

Bir taneciğin gri seviyeli piksel görüntüsü üzerindeki çoklu işlemler, taneciğin topolojisi veya yüzey dokusu ile ilişkilendirilebilen bir dizi şekil tanımlayıcısı üretebilir.

e) Fiziksel spektrumların analizi:

Tek bir taneciğin fiziksel spektrumları üzerindeki birden fazla işlem veya matematiksel işlem, bir dizi tanımlayıcı olarak bilginin şeklini çıkarabilir. Böyle bir prosedür, azimut ışık saçılımı ve kırınım spektroskopisi ile şekil analizi için tarif edilmiştir.



Şekil 2: Şekil açıklaması için bazı yöntemlerin sınıflandırılması (ISO 9276-6:2008 [62]'den uyarlanmıştır)

Nanomalzemelerin zararlılık değerlendirmesi kapsamında, özelliklerin karakterize edilmesi gereken üç form vardır: "imal edildiği gibi", "dozlandığı/maruz bırakıldığı gibi" ve organizma içindeki etkileşim noktasında/noktalarında (bazen kapsamlı olarak "test edildiği gibi" olarak anılır, ancak bu ve aynı derecede özel olmayan yerinde terim, kapsamın daha fazla tanımlanmasını gerektirir). "Dozlandığı / maruz bırakıldığı şekliyle", insanların ve/veya çevrenin maruz kaldığı maddenin durumunu mümkün olduğunca yansıtmalıdır. İkincisi (organizma ile etkileşim noktasında) en zorlu ölçümdür, çünkü invaziv teknikler genellikle organizmanın bütünlüğünden ödün verilmeden ve muhtemelen test geçersiz kılınmadan kullanılamaz, ancak bunun yerine mekanik toksikolojiyi iletirmek için düzenleyici toksikolojiye göre daha ilgi çekici olduğu kabul edilir. İnsan yapımı eşyalar, yetersiz istatistiksel güvenilirlik ve ölçüm ile yorumlamadaki zorluklarla potansiyel olarak karıştırılsa da, bu formu değerlendirmenin dolaylı bir yolu, maruz kalma sonrası değerlendirmede hücrelerdeki, dokulardaki, organlardaki veya daha sonra çevresel ortamlardaki taneciklerin şekil dağılımının (yani bir numunedeki belirli şekillere sahip taneciklerin oranının açıklaması) incelenmesidir.

R.7.1.19.2 Şekle ilişkin mevcut bilgiler

Şekle ilişkin verileri test etme

Tanecik özelliklerinin karakterizasyonu, çok dikkatli numune alımını ve izlenecek numune ayırma uygulamalarını gerektirir. ISO 14488: 2007 [35], tanımlanmış bir güven seviyesiyle temsili olarak kabul edilebilecek tanımlanmış bir tanecikli malzemenin (toz, macun, süspansiyon) numunesinden test alt maddesinin elde edilme yöntemlerini belirtir.

Daha fazla bilgi, Numune Hazırlama ile ilgili Bölüm 2.1.1'de mevcuttur.

Tanecik şekli ve morfolojisinin nicel veya yarı-nicel tanımı için bir dizi farklı yöntem mevcuttur (Tablo 5).

Taneciklerin şekli genellikle morfolojiyi (boyut ve şekil) ve ayrıca agregasyon durumunu araştırmak için birçok nitel ve yarı nicel teknik içeren elektron mikroskobu (örneğin TEM, SEM) ile belirlenir.

Uygun bir şekil tanımlama yönteminin seçimi, mevcut ölçüm tekniğine ve incelenen tanecik sistemine (özellikle boyut aralığına) bağlıdır. Kontur çizgilerindeki matematiksel işlemlere bağlı yöntemler (örneğin, oransal kırılma boyutu analizi veya Fourier analizi), tanecik görüntülerinin nispeten yüksek çözünürlüğünü gerektirir.

Bu, taramalı elektron mikroskobu veya ışık mikroskobu kullanılarak elde edilebilir. Bu gibi faktörlerin yanı sıra, şekil analizinin sonuçları iki boyutlu bir analizdeki tanecik oryantasyonu ile numune hazırlığından (örneğin, numune boyutu ve tüm numuneyi temsil etme özelliği) önemli ölçüde etkilenebilir.

Tablo 5: Tanecik şekli ve morfolojisinin nicel veya yarı nicel tanımı için yöntemler

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralığı	Veri türü
<p>Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM)</p> <p>TEM, ayırma ve numune alma cihazlarından olanlar dahil olmak üzere havadan toplanan veya bir TEM ızgarasında süspansiyon halinde hazırlanan numuneler için kullanılabilir. Toz hazırlama bu yöntem için oldukça kolay ve hızlıdır. Taneciklerin boyutunun ve şeklinin nitel değerlendirmesini ve aglomeratlar ile birincil tanecikler arasında farklılaşmayı sağlar. TEM, çok yüksek bir yerel çözünürlüğe (nm) sahiptir ve 0.2 nm'den daha iyi çözünürlükle kafes düzlemlerini ve atom sıralarını tek tek görüntüleme yeteneğine sahiptir. TEM'e yapılan eklemeler daha fazla bilgi sağlayabilir, örn. Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM), Yüksek Çözünürlüklü TEM (HRTEM) veya Çevresel TEM kullanarak yerinde ölçümler, karakterize edilecek dağılmış numuneler için potansiyel sunar.</p> <p>Bununla birlikte, TEM oldukça yoğun bir yöntemdir ve numunelerin manuel olarak hazırlanmasını gerektirir. Dağılımların seyreltilmesi (yaklaşık % 1'e kadar) veya yoğun çalışma gerektiren donuk kesitler halinde hazırlanması gerekir. Analiz için numunelerin vakum altında kurutulması, karakterize edilen taneciklerin boyutunu ve şeklini değiştirebilir. Numunenin son derece küçük bir alanı analiz edilir ve bu yeterince temsilci olmayabilir. Değerlendirilen taneciklerin nispeten küçük payı (yaklaşık 1.000), sınırlı istatistiksel kesinlik ile sonuçlanır. Sadece iki boyutlu bir tanecik izdüşümü görülebilir ve değerlendirilebilir; ve resimlerin yorumlanması zordur. Aglomerasyon anlamlıysa resim analizi imkansızdır. Bazı numunelerde tanecik konturları net bir şekilde çözülemeyebilir. Analiz edilecek görüntülerin kalitesi kritik öneme sahiptir ve yönelim etkilerinden kaynaklanan önyargılardan kaçınmak için özen gösterilmelidir.</p> <p>Bu yöntemle ilgili daha fazla bilgilendirici bilgi ISO/TR 27628:2007 [33]'de mevcuttur. ISO 13322-1:2004 [38] ve ISO 13322-2:2006 [39], sırasıyla statik ve dinamik görüntü analizi ile tanecik boyutunu belirlerken ölçüm açıklaması ve doğrulaması için genel rehberlik sağlar.</p>	<p>Katı, toz ve süspansiyon formundaki tanecikler. Boyut aralığı: < 0.1 - 10 µm.</p> <p>Tanecik boyutu aralığı 1-500 nm olan tanecikler için özellikle uygundur.</p>	<p>Görüntü; şeklin makro, mezo ve mikro tanımlayıcılarını belirleme fırsatı sunar</p>
<p>Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)</p> <p>SEM, ayırma ve numune alma cihazlarından olanlar dahil olmak üzere havadan toplanan veya bir SEM ızgarasında süspansiyon halinde hazırlanan numuneler için kullanılabilir.</p>	<p>Katı, toz ve süspansiyon formundaki tanecikler. Boyut aralığı: < 0.01 - 10 µm.</p>	<p>Görüntü; şeklin makro, mezo ve mikro tanımlayıcılarını belirleme fırsatı sunar</p>

<p>Numune hazırlama TEM için olduğundan daha kolaydır ve yalnızca az miktarda numune gerekir. Seyreltilmemiş dağılımlar ve emülsiyonlarla test mümkündür. SEM, numunelerin tahribatsız olarak test edilmesini sağlar ve yüksek yerel çözünürlükte boyutun ve şeklin çok hassas bir şekilde belirlenmesi ile birlikte numune yapısının bir görüntüsünü sağlar. Bu yöntem Çevresel SEM olarak yerinde kullanılabilir.</p> <p>Malzemenin temsili bir numunesi kullanılmalıdır. Numunelerin elektriksel olarak iletken olmadığı durumlarda, yüzeye yapışan taneciklerin bir iletken malzeme tabakası ile plazma püskürtmeli kaplaması genellikle gereklidir. Bu işlem, karakterize edilen numuneyi değiştirebilir. Numunenin sadece küçük bir bölümü resmedilmiştir ve görüntüleme, yüzey özellikleriyle sınırlıdır. Analiz edilecek görüntülerin kalitesi kritik öneme sahiptir ve yönelim etkilerinden kaynaklanan önyargılardan kaçınmak için özen gösterilmelidir.</p> <p>Bu yöntemle ilgili daha fazla bilgilendirici bilgi ISO/TR 27628:2007 [33]'de mevcuttur. ISO 13322-1:2004 [38] ve ISO 13322-2:2006 [39], statik olarak tanecik boyutunu belirlerken ölçüm açıklaması ve doğrulaması için genel rehberlik sağlar.</p>	<p>Tanecik boyutu aralığı 10 nm - 1 µm olan tanecikler için özellikle uygundur.</p>	
<p>Taramalı Prob Mikroskobu (SPM)</p> <p>SPM, hem atomik kuvvet mikroskobu hem de taramalı tünelleme mikroskobu (STM) içerir; bunların tümü bazı küçük değişikliklerle taneciklerin biriktirildiği bir substrat boyunca hareket ettirilen tarama probuna (uç adı verilir) dayanır. SPM teknikleri, ayrı ayrı nanotaneciklerin ve agregaların, şeklin çalışılabileceği üç boyutta profillenmesine izin verir. Bu, yalnızca iki boyutu ölçebilen SEM ve TEM'e göre bir avantajdır. Ayırma ve numune alma cihazlarından elde edilenler dahil olmak üzere hava numuneleri veya sıvı dağılımlar değerlendirilebilir. SPM görüntüleri, karbon nanotüpler gibi karmaşık numunelerin üç boyutlu morfolojisini doğrudan verir ve hem atomik yapılarını hem de elektronik yoğunluğunu aynı anda çözebilir. SPM, ortam koşullarında hızlı numune analizi sağlar ve minimum numune hazırlığı gerektirir.</p> <p>Analiz için numune bir alt tabakaya dağılmalı ve ona yapışmalıdır. Görüntünün yorumlanmasına ilişkin netlik eksikliğinden kaçınmak için substratın sertliği, ölçülen tanecik boyutundan daha az olmalıdır. SPM, yatay ve dikey ayrıntıları bir nanometrenin oranlarında çözebilir ancak birkaç nanometrede meydana gelen dikey profildeki büyük değişikliklerle başa çıkamaz.</p> <p>ISO TR/27628:2007 [33], bu yöntemin bilgilendirici bir açıklamasını sağlar.</p>	<p>Havada veya sıvı içinde dağılmış tanecikler</p> <p>Boyut aralığı: 1 nm - 8 µm</p>	<p>Görüntü; şeklin makro, mezo ve mikro tanımlayıcılarını belirleme fırsatı sunar</p>
<p>Optik mikroskobik inceleme</p> <p>Taneciklerin şeklini ve boyutunu etkilememek için numunelerin doğrudan hazırlanması tercih edilir.</p> <p>Bu yöntem, solunabilir ve içe çekilebilir tanecik numunelerinin şeklinin ve dağılımının karakterizasyonu için görüntüler sağlar ve havadaki toz ile dağılmış veya nebülize edilmiş tanecikler ile ilgili değildir.</p>	<p>Lifler dahil her çeşit tanecik</p> <p>Boyut aralığı: 0.2 - 5000 µm.</p>	<p>Görüntü; şeklin makro, mezo ve mikro tanımlayıcılarını belirleme fırsatı sunar</p>

<p>Optik mikroskopi, bilinen lifli veya lif salan maddeler veya diğer verilerle benzerlikleri karşılaştırarak liflerin mevcut olma olasılığını incelemek için kullanılabilir. Lifin kırılmasını ve topaklanmasını önlemek için numune hazırlama sırasında çok dikkatli olunması gerekir. Havadaki liflerle kontaminasyonu önlemek için de özen gösterilmelidir. Numuneler, (a) hafifçe elle çalkalama veya vorteks karıştırma yoluyla suda süspansiyon oluşturarak veya (b) kuru malzemenin doğrudan bakır bant üzerine doğrudan aktarılmasıyla veya kuru liflerin atomizör veya pipet kullanılarak püskürtülmesi yoluyla hazırlanabilir. Uzunluk ve çap dağılımları bağımsız olarak en az iki kez ölçülmeli ve en az 70 lif sayılmalıdır. Belirli bir histogram aralığında hiçbir değer >% 50 veya 3 fiber (hangisi daha büyükse) farklılık göstermemelidir. Uzun ince liflerin varlığı, daha fazla, daha hassas ölçümlere ihtiyaç olduğunu gösterir.</p>	<p>0.2 μm kadar küçük ve 100 μm kadar büyük lif çapları ve 5 μm kadar küçük ve 300 μm kadar büyük lif uzunlukları</p>	
---	---	--

Tablo 5'te listelenen yöntemler kullanılarak aşağıdaki bilgiler sunulmalıdır:

- Numune hazırlama yöntemleri ve kullanılan analiz yöntemleri
- Lot numarası, numune numarası
- Süspansiyon ortamı, sıcaklık, pH
- Mikroskopiden temsili görüntüler
- Şekil tanımlayıcıları
- Kullanılan tüm Standartlara (örn. ISO) referans ve kullanılan referans malzemeler

Şekle ilişkin yayınlanmış veriler

Yayın sırasında tanecik şekli verilerine özgü hiçbir elektronik veri tabanı bulunmamıştır. Şekil analiziyle şekli karakterize eden ticari cihazlarla kullanılan yazılım, test edilen tanecikleri sınıflandırmak için genellikle referans şekillerin kütüphanelerini içerir.

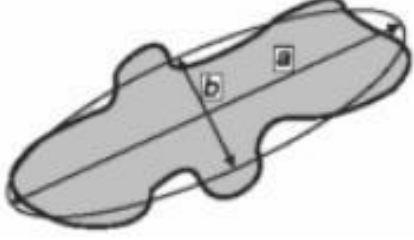
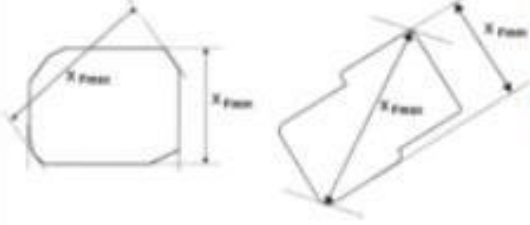

R.7.1.19.3 Şekle ilişkin mevcut bilgilerin değerlendirilmesi

Şekle ilişkin deneysel veriler



Şekil genellikle bir maddenin belirli bir fiziko-kimyasal özelliği değildir. Gerçek şekil, kullanılan endüstriyel işleme yöntemlerine büyük ölçüde bağlıdır ve ayrıca sonraki çevresel veya insan dönüşümlerinden de etkilenebilir. Bu bağlamda, şekil üzerine yayınlanmış herhangi bir veri sadece belirli bir numune veya işleme ilgili olacaktır.

Makro şekilli tanımlayıcılar, taneciklerin geometrik oranlarını temsil eder. Çoğu, farklı geometrik özelliklerin tanımlayıcı oranlarıdır. Makro şeklin geometrik (Tablo 6) ve orantı tanımlayıcıları (Tablo 7), mezo şekil tanımlayıcıları (Tablo 8), şekil tanımlayıcılarının kombinasyonu (Tablo 9) ve (mikro şekil özelliklerini temsil eden) sertlik tanımlayıcıları (Tablo 10) mevcuttur (ISO 9276-6:2008 [62]). Oransal kırılma boyutları, mezo yapılı (içbükeylik) ve mikro şekilli (tanımlayıcılar) arasında ayırım yapmak için gereklidir.

Tablo 6: Geometrik makro şekilli tanımlayıcılar (ISO 9276-6: 2008 [62]'den alınmıştır)

<p>Lengendre atalet elipsi</p> 	<p>Ortası taneciğin ağırlık merkezinde olan ve aynı geometrik aralıklara sahip, gerçek tanecik alanıyla ikinci seviyeye kadar olan bir elips</p> <p>Büyük ve küçük eksenler sırasıyla $x_{L_{maks}}$ ve $x_{L_{min}}$ olarak verilmiştir.</p> <p>Kapsamlı ölçümler.</p>
<p>Feret çapları x_{Fmaks} ve x_{Fmin}</p> 	<p>Paralel teğetler arasındaki mesafeler</p> <p>Maksimum çap x_{Fmaks}, taneciğin "uzunluğuna" karşılık gelir</p> <p>Minimum çap x_{Fmin}, taneciğin "genişliğine" karşılık gelir</p>
<p>Uzunluk x_{LF}</p>	<p>Minimum Fit çapına dik Feret çapı</p>
<p>Jeodezik uzunluk x_{LG}, kalınlık x_E</p> 	<p>Lifler gibi çok uzun ve içbükey tanecikler için daha iyi yaklaşımlar</p> <p>Bir alan ve çevreye eşdeğer dikdörtgen için aşağıdaki denklemleri kullanarak x_{LG}'yi jeodezik uzunluk ve x_E için bir yaklaşım olarak belirleyen kapsamlı yöntem:</p> $A = x_E \cdot x_{LG} \quad P = 2(x_E + x_{LG})$

Tablo 7: Geometrik oranlı makro şekilli tanımlayıcılar (ISO 9276- 6: 2008 [62]'den yeniden üretilmiştir)

<p>Elips oranı</p>	<p>Elips oranı = $x L_{\min} / x L_{\max}$</p> <p>$x L_{\min}$ ve $x L_{\max}$, Legendre elipsinin eksenlerinin uzunluklarıdır.</p> <p>(Ayrıca kullanılan: eliptik şekil faktörü)</p> <p>En-boy oranından daha kapsamlı bir parametre</p>
<p>En boy oranı</p>	<p>Çok uzun olmayan tanecikler için:</p> <p>En boy oranı = $X_{F\min} / X_{F\max}$</p>
<p>Uzama</p>	<p>Lifler gibi çok uzun tanecikler için:</p> <p>Uzama = x_E / x_{LG}</p> <p>(Ayrıca kullanılan: dışmerkezlilik)</p>
<p>Doğruluk</p>	<p>Çok uzun tanecikler için (kivrılmanın tersi):</p> <p>Doğruluk = $X_{F\max} / x_{LG}$</p>
<p>Düzensizlik (Değişiklik oranı)</p> 	<p>Çizilmiş dairenin maksimum çapı $d_{\text{imaks.}}$ ile sınırlanmış dairenin minimum çapı d_{cmin} arasındaki ilişki:</p> <p>Düzensizlik = $d_{\text{imaks.}}/d_{\text{cmin}}$</p> <p>(Ayrıca kullanılan: değişiklik oranı)</p>
<p>Yoğunluk</p>	<p>Taneciğin genel biçimi dikkate alındığında taneciğin (veya izdüşüm alanının) bir daireye benzerlik derecesi:</p> $\text{Kapsam} = \frac{\sqrt{(4A/\pi)}}{X_{F\max.}}$ <p>Yuvarlaklık R_n de kullanılır, ancak daha az kapsamlıdır:</p> $R_n = 4A / \pi X_{F\max.}^2$
<p>Kapsam</p>	$\text{Kapsam} = \frac{A}{X_{F\max.} - X_{F\min.}}$ <p>(Ayrıca kullanılan: hacimlilik)</p>
<p>Kutu oranı:</p> 	<p>Feret Kutusu'nun alanının öngörülen alana oranı:</p> <p>Kutu oranı = A / A_{kutu}</p> $A_{\text{kutu}} = X_{F\min} \cdot X_{LF}$ <p>Yönlendirmeye oldukça hassastır</p>

Tablo 8: Mezo şekilli tanımlayıcılar (ISO 9276-6:2008 [62]'den alınmıştır)

Wadell'in küreselliği ψ	$\phi = (X_v/X_c) = \pi \cdot X_v^2/S$
Dairesellik C	<p>Çevrenin düzgünlüğü dikkate alındığında taneciğin (veya izdüşüm alanının) bir daireye benzerlik derecesi:</p> $C = \sqrt{\frac{4\pi A}{p^2} + \frac{x_A}{x_P}}$ <p>(Karekök işaretinin altındaki terime FF faktöründen denir)</p>
Dayanıklılık	<p>Bir taneciğin genel içbükeyliğinin ölçüsü:</p> $\text{Dayanıklılık} = A/A_c$ <p>A_c, taneciği sınırlayan dışbükey gövdenin (zarf) alanıdır.</p> <p>Küresel yüzeyin dışbükeylik indeksi (CI) ve dışbükeylik de kullanılır:</p> $CI = \frac{A_c - A}{A} \quad \text{Concavity} = \frac{A_c - A}{A_c}$
Dışbükeylik	<p>Dışbükeylik = P_c/P</p> <p>P_c, taneciği sınırlayan dışbükey gövdenin (zarf) çevresinin uzunluğudur.</p>
Ortalama içbükeylik	$\phi_{FP} = \frac{\bar{X}_F}{X_P}$ <p>Açı-ortalama Feret çapı şu şekilde verilmiştir: X_F</p> $\bar{X}_F = \frac{1}{\pi \int^x X_F(a) da}$
Taneciğin sağlamlığı Ω_1	$\Omega_1 = \frac{2\omega_1}{\sqrt{A}}$ <p>ω_1, gölgenin tamamen yok edilebilmesi için gerekli aşınma sayısıdır.</p>
En büyük içbükeylik indeksi Ω_2	$\Omega_2 = \frac{2\omega_2}{\sqrt{A}}$ <p>Burada ω_2, A_c alanının dışbükey gövdesine göre ayarlanan artık gölgenin tamamen yok edilebilmesi için gerekli aşınma sayısıdır.</p>



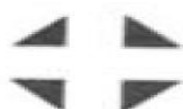
Nesne



Nesne

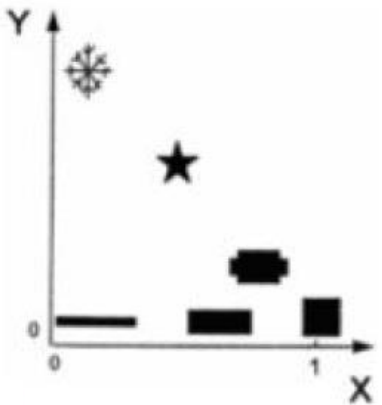


Dışbükey gövde




Dışbükey
gövdeye
tamamlayıcı B

Tablo 9: Şekil tanımlayıcılarının kombinasyonu (ISO 9276- 6: 2008 [62]'den yeniden üretilmiştir)

<p>İçbükeylik/sağlamlık oranı Ω_3</p>  <p>Anahtar X sağlamlık Ω_1 Y en büyük içbükeylik indeksi Ω_2</p>	<p>İkincil mezo şekilli tanımlayıcı:</p> $\Omega_3 = \frac{\Omega_2}{\Omega_1} = \frac{\omega_2}{\omega_1}$
---	---

Tablo 10: Sertlik tanımlayıcısı (ISO 9276-6: 2008 [62]'den yeniden oluşturulmuştur)

<p>Oransal boyut D_F</p> 	<p>Çevrenin uzunluğu $P(\lambda)$ ile aşamaların uzunluğu λ arasındaki ilişki, Richardson grafiği olarak bilinen bir log-log grafiği üzerinde doğrusaldır.</p> <p>Veriler ilk önce maksimum Feret çapına bölünerek normalize edilir</p> <p>Adım boyu için üst sınır şu şekildedir:</p> $\lambda = 0,3x_{F_{\max}}$ <p>Düz çizginin denklemi: $\log P(\lambda) = (1 - D_F) \log \lambda + \log b$</p>
---	---

Şekil hakkında deneysel olmayan veriler

Şu anda, tanecik şeklini doğru bir şekilde tahmin etmek için QSPR/QSAR araçları bulunmamaktadır. Bu nedenle, özelliğin deneysel olarak belirlenmesi gerekecektir.

Şekil üzerinde kalan belirsizlik

Agregalar ve aglomeralar arasında ayırım yapmak faydalıdır. Bir aglomeranın çoğu durumda kalıcı olduğu düşünülebilirken, aglomeralar belirli koşullar altında parçalanabilir. Küçük tanecikler genellikle aglomeratlar oluşturduğundan, şeklin boyutunun belirlenmesinden önce numunenin ön işlemden geçirilmesi (örn. dağıtıcı maddelerin eklenmesi, çalkalama veya düşük seviyeli ultrasonik işlem) gerekebilir.

Bununla birlikte, numune hazırlama sırasında taneciğin şeklini veya boyutunu değiştirmekten ve herhangi bir dağıtıcının test sonuçları üzerindeki etkisinden kaçınmak için büyük özen gösterilmelidir.

Şekli tanımlamak için terimlerin ve/veya ölçülen büyüklüklerin bir kombinasyonuna ihtiyaç duyulabilir; bu, malzemelerin aynı anda farklı zararlılık potansiyellerini sunabilen bir numunede birden çok şekil gösterebildiği halihazırda öngörülebilir zorlukların üstesinden gelmek için gereklidir.

Görüntü analizi ile ilgili sorunlar çok çeşitlidir ve şekil tanımlayıcılarının oluşturulmasında hatalar ortaya çıkabilir. Bu hatalar pek çok düzeyde olabilir, ancak çoğu, dağınık maddenin karakterizasyonu için kullanılan daha geleneksel tekniklerde gözlemlenenlerden temelde farklıdır. Bu tür şekil tanımlayıcı hataları genellikle herhangi bir görüntü üzerinde hesaplama yapmak için gerekli protokoller tarafından ortaya çıkarılır (ISO 13322-1:2004 [38], Ek D). Görüntü analizi yapılırken ve görüntü analizi protokollerinin karşılaştırılmasında ortaya çıkan yaygın hata kaynakları arasında görüntü çözünürlüğü, veri çiftleme ve şekil tanımlayıcılarının hesaplanması için algoritmalar bulunur (ISO 9276-6:2006 [62]).

R.7.1.19.4 Şekle ilişkin sonuçlar

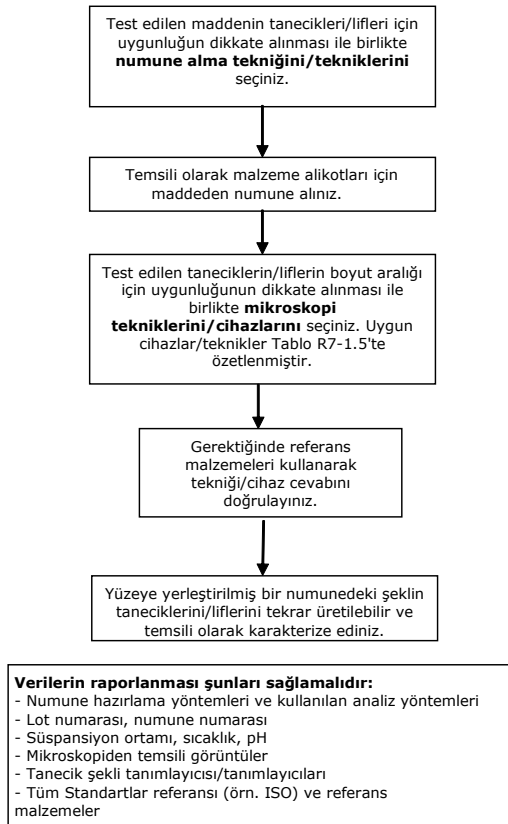
Şekil, biyolojik ortamdaki birikim, yüzeye tutunma kinetiği ve zararlılık değerlendirmesinin değerlendirilmesi için bağlamsal değeri olan bazı taneciklerin karakterizasyonunda önemli bir parametredir. Karşılık gelen üç şekil seviyesi ayırt edilebilir: makro şekil, mezo şekil ve mikro şekil. Taneciklerin şekli genellikle morfolojiyi (boyut ve şekil) ve ayrıca agregasyon durumunu araştırmak için birçok nitel ve yarı nicel teknik içeren elektron mikroskobu (örneğin TEM, SEM) ile belirlenir.

S&E ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesinin Sonuçlandırılması

Şekil, sınıflandırma ve etiketleme kriteri olarak kullanılmaz. Bununla birlikte, madde ile ilişkili riskler göz önünde bulundurulduğunda kimyasal güvenlik değerlendirmesinde kullanılabilir.

R7.1.19.5 Şekil için bütünleşik test stratejisi (BTS)

Aşağıdaki şematik diyagram (Şekil 3), şekil için bütünleşik bir test stratejisi sunar.



Şekil 3: Şekil için Bütünleşik Test Stratejisi (BTS)

2.2.3.4 Yüzey alanı için öneriler

R.7.1.20 YÜZEY ALANI

Yüzey, tanecik bazlı maddeler için fiziksel ve kimyasal etkileşimleri etkilemede önemli bir rol oynar. Yüzeylerde kimyasal reaksiyonlar meydana geldikçe, yüksek özgül yüzey alanı/hacim oranına sahip bir malzemenin numunesinin, düşük özgül yüzey alanı/hacim oranına sahip aynı malzemenin bir numunesine göre daha yüksek bir reaktiviteye sahip olması beklenebilir.

Yüzey alanı, nanotaneciklerin karakterizasyonunda önemli bir parametredir ve zararlılık değerlendirmesi için bir doz ölçütü veya doz tanımlayıcısı olarak nicel değerler ortaya çıkan kanıtları vardır. Toplam yüzey alanı, daha küçük taneciklerin birincil, agrega veya aglomera haline getirilmiş tanecikler olarak mevcut olup olmadıklarından bağımsız olarak daha büyük bir özgül yüzey alanına sahip olduğu özgül yüzey alanıyla karıştırılmamalıdır. Nano ölçekli malzemeler için boyuttaki azalmaya, yüzey/hacim oranındaki doğal bir artış eşlik etmektedir.

Özgül yüzey alanı, nanomalzemelerin yüzeyce işlevselleştirildiği durumlarda yüzey yükünü belirleyecektir. Bunun da (a) doğal olarak oluşan diğer tanecikli maddelerle (yani kontamine edici vektörler) nanomalzeme etkileşimi (yani aglomerasyon); (b) yüzey ligandı-biyolojik arayüzünün bir fonksiyonu olarak maruz kalma yolu (yani, biyobirikim yolu, biyoyararlanım); ve (c) toksisite mekanizmaları (örneğin, yüzey alanı için normalize edilmiş doz cevabı eğrileri, kütle başına sunulan sonuçlara kıyasla farklı sonuçlar gösterebilir) [6].

Hacme özgü yüzey alanı (VSSA), tüm dış ve/veya iç yüzeyler ile tüm boyut aralığı dağılımı dahil olmak üzere tanecikli toz malzemenin bütününden belirlenir. Bir katı ve/veya toz malzemenin hacmi başına tanecik yüzey alanının tümünü karakterize eder. VSSA, kuru ve katı nano yapıları malzemeyi, malzeme hacmi başına ayrılmaz malzeme yüzey alanına bağlı olarak nanoyapılı olmayan malzemedan ayırmak için kullanılabilir ([64], [65]).

Bazı nanotaneciklerin toksisitesinin, küçük boyutları ve dolayısıyla yüksek yüzey alanları ile ilişkili olduğu bir dizi çalışmada gösterilmiştir (örneğin [66], [67], [68], [69]). Ayrıca, birkaç nanotoksosite çalışmasında bir doz ölçütü olarak etkilerin kütleden ziyade yüzey alanıyla (örneğin [70], [71], [72], [73]) daha büyük ölçüde ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Diğer çalışmalar, bazı durumlarda kütlenin veya hacmin daha iyi bir tanımlayıcı olabileceğini göstermiştir. Bu aşamada, farklı toksikolojik profillerin ve fiziko-kimyasal özelliklerin karmaşıklığı göz önüne alındığında, tek bir metriğin uygun veya mümkün olup olmayacağı konusunda hiçbir bilimsel fikir birliğine varılamamıştır.

Yüzey alanı tanımları

Yüzey alanı, tek bir taneciğin maruz kalan yüzeyinin alanı veya daha genel olarak, belirli bir miktar malzemenin açıkta kalan yüzeyinin alanı olarak tanımlanır [6].

Kapsamlı bir miktar olarak yüzey alanı, malzemenin miktarına bağlıdır ve bu nedenle yüzey alanının belirli bir miktar malzemenin kütlesine oranı olarak tanımlanan daha iyi karşılaştırılabilir bir özelliktir. Bu, yoğun bir miktar ve dolayısıyla malzeme miktarından bağımsız olan özgül yüzey alanıdır. Bir malzemenin hacme özgü yüzey alanı (VSSA), yalnızca analiz edilen malzemenin tamamı için geçerli olan toplu bir ölçümdür; malzemenin bir oranı/alt kümesi analiz edilirse (örneğin, boyuta göre oranlanmış), bu alt küme, tüm malzemenin VSSA'sının üstünde veya altında olabilecek farklı bir VSSA'ya sahip olacaktır.

Özgül yüzey alanı = kütlesine bölünen bir malzemenin yüzey alanı [SI birimi: m²/kg].

Hacme özgü yüzey alanı = yoğunluk, özgül yüzey alanıyla çarpılır [SI birimi: m²/cm³].

R.7.1.20.1 Yüzey alanı üzerine bilgi gereklilikleri

Madde katı olmayan veya granüler formda piyasaya arz edildiyse ya da kullanıldıysa çalışmanın gerçekleştirilmesi gerekmez. Özgül yüzey alanı, suda çözünmezlik hakkında bilgi gerektirir. Lif uzunluğu ve çap dağılımları, ürünün lifli yapısı ve lifli şeklin elektron mikroskobu koşulları altındaki kararlığı hakkında bilgi gerektirir.

Özet, incelenen malzemenin özgül yüzey alanı [m^2/kg] ve (uygun olduğunda) hesaplanan hacme özgü yüzey alanı [m^2/cm^3], ölçümlerin yapıldığı sıcaklığı, kullanılan numunenin saflığını, fiziksel durumunu ve kullanılan yöntem ile referans maddeyi (varsa) içermelidir.

R.7.1.20.2 Yüzey alanıyla ilgili mevcut bilgiler

Yüzey alanıyla ilgili test verileri

Tanecik özelliklerinin karakterizasyonu, çok dikkatli numune alımını ve izlenecek numune ayırma uygulamalarını gerektirir. ISO 14488: 2007 [35], tanımlanmış bir güven seviyesiyle temsili olarak kabul edilebilecek tanımlanmış bir tanecikli malzemenin (toz, macun, süspansiyon) numunesinden test maddesinin elde edilme yöntemlerini belirtir. Daha fazla bilgi bu ekin Numune Hazırlama ile ilgili Bölüm 2.1.1'inde mevcuttur.

Taneciklerin yüzey alanını ölçmek için en yaygın teknik, Brunauer, Emmet ve Teller (BET) yüzeye tutunma izotermi teorisini kullanan gaz emilimi ölçümleridir (Tablo 11) [74]. Bu, yüksek vakumlu bir yöntemdir ve nanomalzemenin temiz, kuru bir numunesini gerektirir. Argon, karbondioksit veya kripton gibi diğer birçok gazın da kullanılmasına rağmen, azot en yaygın yüzeye tutunanlardandır. BET tekniği, buharlaşma sırasında salınan yüzeye tutunmuş madde miktarının ölçülmesini içerir. BET yüzeyi, gazlara serbestçe erişilebilen yüzey alanını temsil eder. Birincil tanecik çapı (eşdeğer küre çapı olarak kabul edilir) daha sonra mevcut özgül yüzey alanı ve tanecik yoğunluğundan hesaplanır. Bu yöntem aynı anda iki parametrenin, yani boyut ve yüzey alanının ölçümünü sağlasa da, bu prosedürün dezavantajı yalnızca ortalama bir boyut bildiren ve boyut dağılımı veya bir yüzey alanı dağılımını sağlamayan tek dağılımlı küresel bir sistemin varsayımına dayanmaktadır.

Nanotaneciklerin dağılımındaki taneciğin yüzey alanını ölçmek için ortaya çıkan teknikler ticarileştirilmektedir, ancak nano dağılımlarının özgül yüzey alanının belirlenebilmesi için NMR analizi sistemi gibi henüz standartlaştırılmamıştır. Bu teknik, bir taneciğin yüzeyine temas eden veya bu yüzeye "bağlanan" sıvının "serbest" sıvınıkinden farklı davrandığı gerçeğine dayanmaktadır. Serbest sıvı sınırsız hareket edebilirken, bağlı sıvının molekülleri kısıtlı harekete maruz kalır. Taneciğin yüzeyine "bağlanan" sıvının NMR gevşeme süresi, "serbest" sıvınıkinden çok daha kısadır, fark birkaç büyüklük derecesinde olabilir. Çoğu durumda, yüzeydeki ve sıvının geri kalanındaki sıvının molekülleri arasında hızlı bir değişim vardır ve ortalama gevşeme süresi ölçülebilir; bu, daha sonra, mevcut taneciğin yüzey alanı miktarının doğrudan bir ölçüsüdür.

Tablo 11: Yüzey alanının belirlenmesi için Brunauer, Emmet ve Teller (BET) yöntemi

Yöntem ve ayrıntılar	Malzeme ve boyut aralığı	Veri türü
<p>BET yöntemi (ISO 9277: 2010 [75]; ISO 18757:2005 [76])</p> <p>Fiziksel olarak emilen gaz miktarını ölçerek toplam özgül dış ve iç yüzey alanının belirlenmesini sağlar. Nanomalzemelerin yüzey alanını belirlemek için yaygın olarak uygulanır. Tozların aglomerasyon durumunun değerlendirilmesine izin verir.</p> <p>Yöntem, tek dağılımlı küresel bir sistemi varsayar ve kuru bir taneciğin yüzey alanının ölçümünü sağlar; bu, maruz kalma ortamında dağıldığında taneciğin yüzey alanını zorunlu olarak temsil etmez. Uygun çalışma koşullarını ve doğru veri değerlendirmesini sağlamak için, cihaz performansı bir yüzey alanı referans malzemesi kullanılarak periyodik olarak izlenmelidir. BET yöntemi, ölçüm gazını emen katı maddelere güvenilir bir şekilde uygulanamaz.</p> <p>ISO 9277:2010 [75] tip II [dağılmış, gözeneksiz veya makro gözenekli katılar] ve tip IV [mezogözenekli katılar, 2-50 nm arasındaki gözenek çapı] yüzeye tutunma izotermine uygulanabilir. ISO 18757:2005 [76], dağılmış veya gözenekli [gözenek çapı > 2 nm] ince seramik malzemelerin toplam özgül dış ve iç yüzey alanının belirlenmesi için geçerlidir.</p>	<p>Dağınık veya gözenekli katılar (örn. tozlar)</p>	<p>Özgül yüzey alanı (m²/kg)</p>

BET yöntemini kullanılması sonucunda sonuçlar bildirilirken aşağıdaki bilgiler sunulmalıdır:

- numune hazırlama yöntemleri ve kullanılan analiz yöntemleri
- lot numarası, numune numarası
- ön uygulama ve gazdan arındırma koşulları, örn. bir vakumda veya inert gaz akışında gazın giderilmesi, sıcaklık ve gazın giderilme süresi;
- gazı giderilmiş numunenin kütlesi;
- emici (kimyasal yapı, saflık);
- yüzeye tutunma izotermi (n_a , bağıl basınca karşı çizilmiştir, p/p_0), ölçüm sıcaklığı;
- değerlendirme parametreleri: çok noktalı veya tek noktalı belirleme, BET grafiği veya doğrusallık aralığı, tek katman miktarı, BET C parametresi, kullanılan moleküler kesit alanı;
- özgül yüzey alanı;
- tüm Standartlar referansı (örneğin ISO) ve kullanılan referans malzemeler

Yüzey alanı ile ilgili yayınlanmış veriler

Yayın sırasında taneciğin yüzey alanı verilerine özgü hiçbir elektronik veri tabanı bulunamamıştır.

R.7.1.20.3 Yüzey alanıyla ilgili mevcut bilgilerin değerlendirilmesi

Yüzey alanı hakkında deneysel veriler

Yüzey alanı, bir maddenin belirli bir fiziko-kimyasal özelliği değildir. Yüzey alanıyla ilgili yayınlanan herhangi bir veri, yalnızca belirli bir numuneyle veya işlemle ilgili olacaktır.

Yüzey alanı hakkında deneysel olmayan veriler

Şu anda, nanomalzemelerin yüzey alanının doğru bir şekilde tahmin edilmesi için QSPR/QSAR araçları mevcut değildir. Bu nedenle, özelliğin deneysel olarak belirlenmesi gerekecektir.

Yüzey alanında kalan belirsizlik

Çoğu durumda, özgül yüzey alanı ölçümleri, prob molekülünün doğasına bağlı olarak türetilmiş miktarlardır [77]. Gözenekli malzemeler söz konusu olduğunda, dış ve iç yüzeyler arasında ayırım yapmak genellikle yararlıdır. Dış yüzey genellikle ayrı tanecikleri veya aglomeraları çevreleyen zarf olarak kabul edilir, ancak kesin olarak tanımlanması zordur çünkü katı yüzeyler atomik ölçekte nadiren düzgündür. Dış yüzey tüm çıkıntıları ve ayrıca derinliklerinden daha geniş olan bu çatlakların yüzeyini içerir; iç yüzey, genişliklerinden daha derin olan ve bir test gazına (emici) erişilebilen tüm çatlakların, gözeneklerin ve boşlukların duvarlarını içerir. Uygulamada, sınırın belirlenmesi değerlendirme yöntemlerine ve gözenek boyutu dağılımının doğasına bağlıdır; bu nedenle gözeneklerin erişilebilirliği, gaz moleküllerinin boyutuna ve şekline, gaz emilimi ile belirlenen ve emici moleküllere (moleküler elek etkisi) bağlı olan iç yüzeyin alanı ve onu çevreleyen hacme bağlıdır.

Tüm tanecikli malzemeler, anlamlı bir VSSA tespitine tabi değildir; iç bileşenlerin özünde ölçülemediği karmaşık yapısal düzeneklere sahip maddelerin özgül yüzey alanı buna örnektir.

R.7.1.20.4 Yüzey alanına ilişkin sonuçlar

Yüzey, tanecik bazlı maddeler için fiziksel ve kimyasal etkileşimleri etkilemede önemli bir rol oynar. Yüzey alanı, özellikle nanotaneciklerin karakterizasyonunda önemli bir parametredir ve zararlılık değerlendirmesi için bir doz ölçütü veya doz tanımlayıcısı olarak nicel değerler ortaya çıkan kanıtları vardır. Yüzey alanı, nanomalzemelerin yüzeyce işlevselleştirildiği durumlarda yüzey yükünü belirleyecektir, bu da nanomalzemenin etkileşimi (yani aglomerasyon) ile doğal olarak oluşan diğer taneciklerin etkileşimi, yüzey ligandı-biyolojik arayüzün bir fonksiyonu olarak maruz kalma yolu ve toksisite mekanizmaları üzerinde doğrudan sonuçlara neden olacaktır [6]. Taneciklerin yüzey alanını ölçmek için açık ara en yaygın teknik, Brunauer, Emmet ve Teller (BET) yüzeye tutunma izotermi teorisini kullanan gaz emilimi ölçümleridir.

S&E ve Kimyasal Güvenlik Değerlendirmesinin Sonuçlandırılması

Yüzey alanı, sınıflandırma ve etiketleme kriteri olarak kullanılmamaktadır. Bununla birlikte, madde ile ilişkili riskler göz önünde bulundurulduğunda kimyasal güvenlik değerlendirmesinde kullanılabilir.

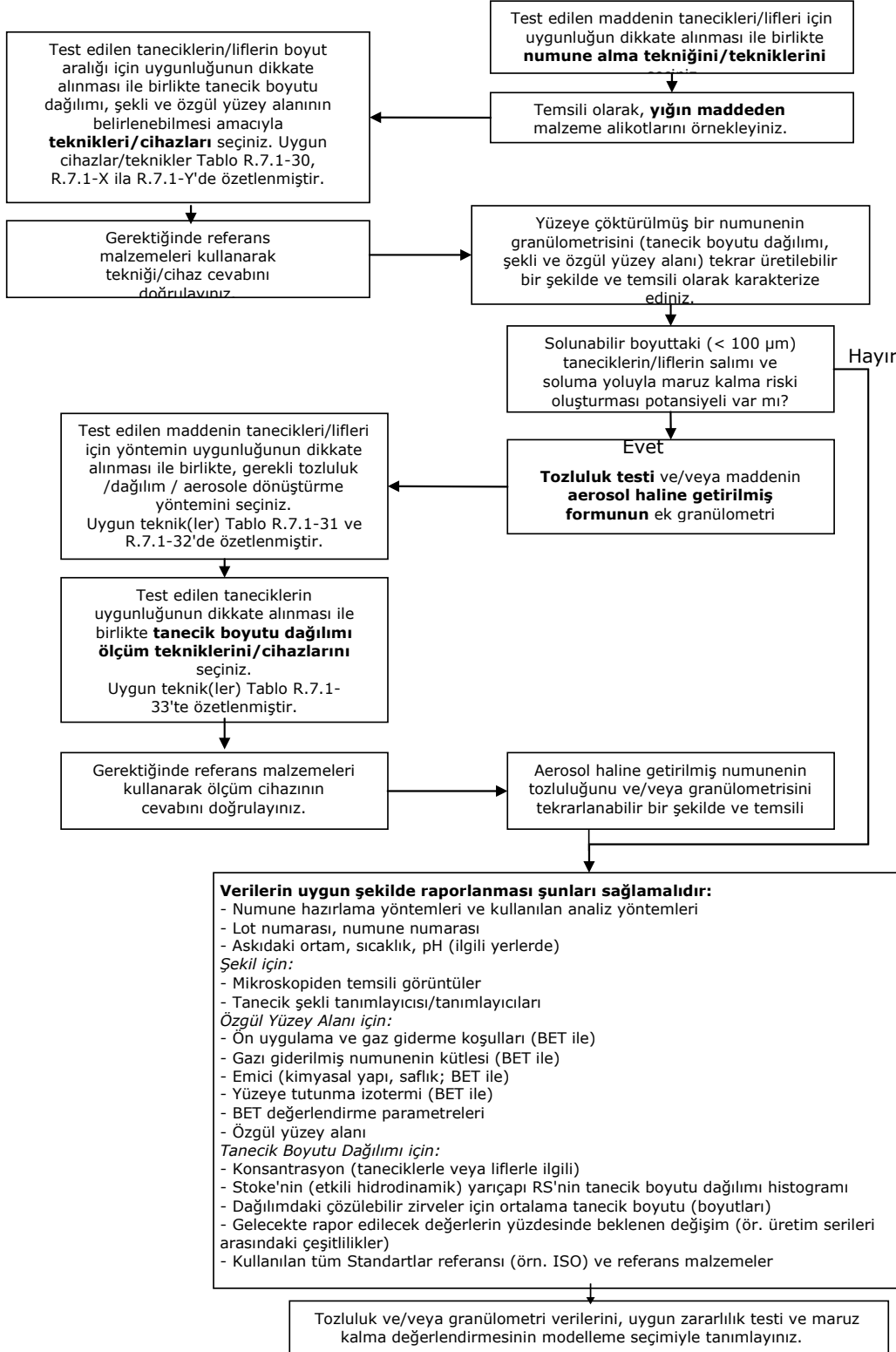
R.7.1.20.5 Yüzey alanı için bütünleşik test stratejisi (BTS)

Teste yönelik aşamalı yaklaşım (Bölüm R.7.1.14), uygun bir test yönteminin seçimi ile birleştirilir ve granülometri için BTS (R.7.1.14.4) ile birlikte uygulanır, belirli yüzey alanı için bütünleşik bir test stratejisini temsil eder.

1 2.2.3.3 Tanecik boyutu dağılımı, yüzey alanı ve şekli için Ortak Bütünleşik Strateji

2

3



4

5

Şekil 4: Tanecik boyutu dağılımı, yüzey alanı ve şekli için ortak BTS

6

2.2.4 Yüzeye tutunma(adsorpsiyon)/Yüzeyden sıyrılma (desorpsiyon)

Ana rehberde, bu sonlanma noktasını belirlemeye yönelik yöntemler, Tablo R.7.1- 14 "Yüzeye tutunma ölçümü yöntemleri" içinde gösterilmektedir. "Yüzeye tutunma/yüzeyden sıyrılma ölçümleri, davranış modellemesinde çevredeki hangi ortamın en çok maruz kalacağını veya zararlılık ve risk değerlendirmesinde dikkate alınması gerekebileceğini belirtmek için kullanılır. Bu ölçümler, maddenin hangi çevre ortamında (örn. toprak, çökelti veya su) ortaya çıkma olasılığının çok olduğunun ve çevrede hareketli veya hareketsiz olma olasılığının belirlenmesine yardımcı olur. Örneğin, toprak yüzeyine yüksek tutulma, hem toprağın hem de çökeltinin zararlılık değerlendirmesinde dikkate alınması gereken yüksek derecede ilgili çevresel ortamların olduğunu gösterecektir.

Yüzeye tutunma⁴, madde ile bir yüzey arasındaki geçici (tersinir) veya kalıcı bağlanmadır. Nanomalzemeler ile ilgili olarak, katı faz ve sıvı faz arasındaki dağılım katsayısının (K_d), organik karbon-su dağılım katsayısından (K_{oc}) ve oktanol-su dağılım katsayısından türetilen K_d tahminleri nedeniyle gerçek teste dayanması gerekebilir. Nanomalzemeler söz konusu olduğunda (K_{ow}) uygulanamayabilir. K_d ölçümü ayrıca sıvı ve katı faz arasındaki termodinamik denge varsayımına da dayanmaktadır. Denge dağılımı, 2.2.2 "n-oktanol/su dağılım katsayısı" bölümünde açıklandığı üzere çözünmemiş nanotanecikler ([12], [22], [23];) için geçerli değildir. Bu nedenle, nanotanecikler her zaman çözelti oluşturmazlar, bunun yerine çok fazlı sistemler olan ve termodinamik olarak kararsız olan koloidal dağılımlar oluşturabilirler. Bu nedenle, nanotaneciklerin dağılımları uzun bir süre boyunca kinetik olarak kararlı olabilir (tipik olarak elektrostatik veya uzamsal dengelikleşme yoluyla), ancak hiçbir zaman termodinamik dengeye ulaşamayacak ve sonuç olarak ek bir fazla dengelenemeyeceklerdir [23], [78].

Bu nedenle nanotanecikler, birbirlerine eklenerek yüzey enerjilerini azaltmaya çalışırlar. Eklenme:

- aynı nanomalzemenin tanecikleri arasında homoaglomerasyon/agregasyon veya
- diğer taneciklerle veya örneğin organik madde ile heteroaglomerasyon/agregasyon veya
- fazlar arasındaki arayüz (biriktirme veya bağlanma) olabilir.

Tanecik bağlanmasına katkıda bulunan fizikokimyasal kuvvetleri doğru bir şekilde ölçmememiz nedeniyle, bu adım tipik olarak aglomerasyon (hetero-aglomerasyon) veya biriktirme deneylerinde belirlenmesi gereken taneciğin bağlanma verimliliği (α) olarak adlandırılan yapay bir parametre ile tanımlanır [22], [78].

OECD Test Rehberi 106 Kesikli Denge Yöntemi Kullanarak Yüzeye Tutunma - Yüzeyden Sıyrılma nanomalzemeler için geçerli değildir çünkü santrifüjleme sırasında agrega/aglomera haline getirilmiş nanotanecikler arasında şu anda ayırım yapmak mümkün değildir ve yeni bir Test Rehberi geliştirilmelidir ([8], [79]). Bununla birlikte, bir nanomalzemenin hızlı ve yüksek oranda çözüldüğü gösterilirse normal kimyasallarla aynı şekilde değerlendirilebilir ve ana rehber uygulanabilir.

Nanotaneciklerin yüzeye tutunmasının/yüzeyden sıyrılmasının şu anda mevcut yöntemlerle değerlendirilmesinde, OECD Test Rehberi 106 gibi organik karbon-su dağılım katsayısından (K_{oc}) ve oktanol-su dağılım katsayısından (K_{ow}) türetilen K_d 'ye bağlı olarak nanotaneciğin özgül özelliklerini ve kısıtlamalarını göz önünde bulundurmamak gerekir. Sonuç olarak, düşük yüzeye tutunmaya/yüzeyden sıyrılmaya bağlı bilgi gerekliliğinden feragat edilmesi, kullanılan test yönteminin uygulanabilirliğinin kapsamlı bir tekniği ve bilimsel gerekçesi ile her zaman desteklenmelidir.

2.2.4.1 Koc veya K_d için diğer rehberler ve protokoller

OECD Test Rehberi 312 Toprak Sütunlarında Sızıntı [80], test maddesinin hareketliliğinin ve daha derin toprak katmanlarına veya yer altı sularına sızmasının incelenmesine izin verir.

⁴ Dağılımın yüzeye tutunmaya eşit olmadığını ve Yüzeyden Sıyrılma ile Yüzeye Tutunma olaylarından oluşan soğurmanın da eşit olmadığını lütfen unutmayınız.

Maddeyi toprağın daha derin katmanlarında veya yer altı suyunda test ediniz. OECD Test Rehberi 312 kullanılarak, K_d değerleri kolon sızıntı çalışmalarından türetilebilir ve bunlar genel olarak nanomalzemeler için geçerli kabul edilir.

Topraktaki nanomalzemelerin alıkonmasının tarama teknikleriyle [23] veya K_d ile belirlenmesine ve kolloidal süspansiyonlara veya termodinamik dengeye ulaşmamış taneciklere bağlı diğer eşitliklere göre nanotaneciklerin yüzeye tutunmasını/yüzeyden sıyrılmasını açıklamak için alternatif yaklaşımlar ve ölçümler tartışılmıştır.

Nanotanecikler için (hetero) aglomerasyon, agregasyon, taneciğin bağlanması ve uzaklaştırılması gibi K_d veya log K_{oc} dışındaki diğer parametreler düşünülebilir. Aglomerasyon davranışı, nanomalzemelerin çevresel davranışını etkileyen önemli bir parametre olarak tanımlanmıştır. Aglomerasyon parametresi, nanomalzemenin kendisinin fizikokimyasal özelliklerine, süspansiyon ortamının fizikokimyasal özelliklerine, süspansiyon hazırlığına, nanomalzemenin konsantrasyonuna ve süspansiyondaki diğer maddelerin ve taneciklerin konsantrasyonuna bağlıdır. Aglomerasyon davranışı, termodinamik denge yerine kinetik denge (enerji bariyerleri) tarafından kontrol edilir. Bu nedenle, nanomalzemelerin aglomerasyon ve agregasyon davranışına ilişkin bilgilerin ileri testlerden önce oluşturulması önerilir.

- Nanomalzemelerin Farklı Sucul Ortamlardaki Aglomerasyon Davranışı Üzerine Taslak OECD Test Rehberi [27] <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-guidelines-for-comments-section3-degradation-and-accumulation.htm> adresinde mevcuttur.

Soğurmanın belirlenmesi, yüzey sularına, toprağa ve çökeltilere salınan nanomalzemelerin miktarlarının değerlendirilmesinde kritiktir ([81], [82], [83]; [84]). Nanomalzemelerin emilimini tahmin etmek için başka bir alternatif yaklaşım olarak taneciğin bağlanması ve atık sudan uzaklaştırılması yaklaşımı kullanılabilir.

- Örneğin, OECD Test Rehberi 303A "Aerobik Atık Su Arıtma Simülasyon Testi", nanomalzemelerin çamur ve atık su arasındaki dağılımını belirleyerek nanomalzemelerin çamura emilimini tahmin etmek için dolaylı bir ölçüm olarak kullanılabilir.

Bu alternatif yaklaşımlar hala geliştirilme aşamasındadır ve daha fazla doğrulama gerekmektedir. Mevcut olduklarında, nanomalzemelerin soğurması ve aglomerasyonu/agregasyonu hakkında uygun ve alternatif bilginin sağlanabilmesi amacıyla bir araç olarak önerilecektir. Nanomalzemelerin bağlanma veya birikimlerinin herhangi bir alternatif ölçümüne geçmeden önce, çözünme hızının ve aglomerasyon davranışının ön değerlendirmesine ihtiyaç vardır ([8], [12], [85]).

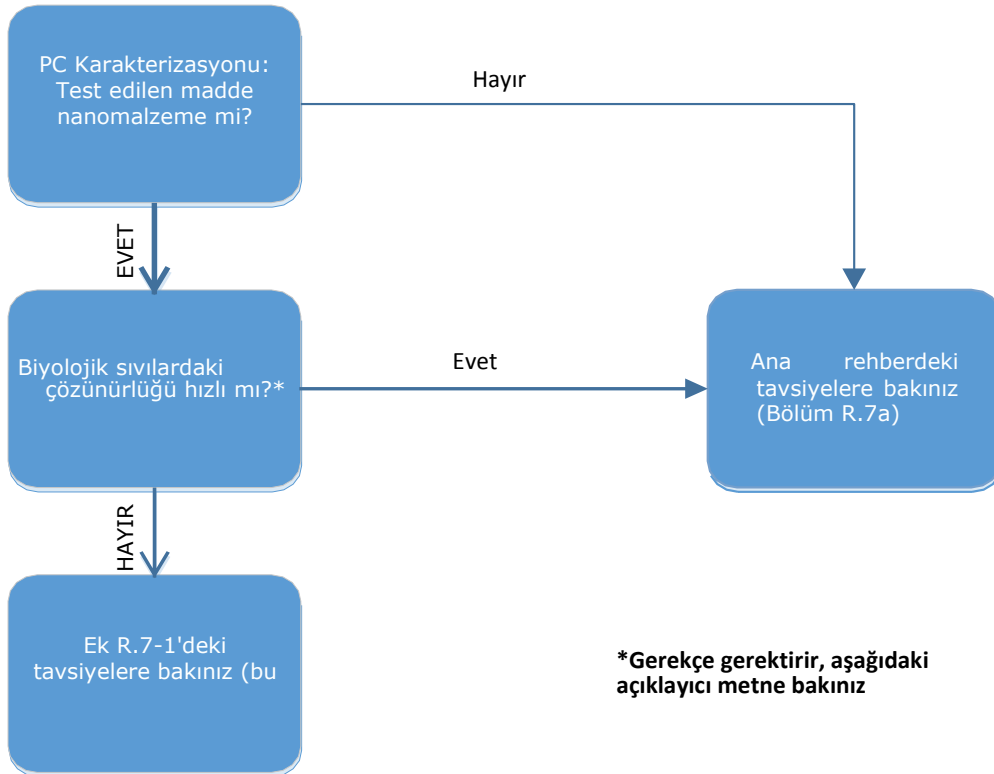
K_{oc} ve K_d ölçümlerinin geçerli olmaması durumunda diğer test dışı yöntemler de düşünülebilir. Nanomalzemeler için alternatif davranış tanımlayıcılarını tahmin etmek amacıyla mevcut modellerin bir listesi Ek 1'de mevcuttur.

3 NANOMALZEMELER İÇİN TOKSİKOLOJİK BİLGİ GEREKLİLİKLERİ İLE İLGİLİ ÖNERİLER

3.1 Genel tavsiye notları

3.1.1 İnsan sağlığı sonlanma noktaları için test ve numune alma stratejisi ve numune hazırlama hakkında genel tavsiye notu

Bu tavsiye notları bir protokol önermez, bunun yerine nanomalzeme testleri için özellikle önemli olan belirli yönleri ve ilgili kaynakların referanslarıyla ilgili yararlı tavsiyeler sağlamayı amaçlamaktadır. Fiziko-kimyasal karakterizasyonu ile nanomalzeme olarak tanımlanan bir test malzemesi için test stratejisi, ilgili biyolojik sıvılardaki ve test ortamındaki çözünürlük ile çözünme potansiyeline bağlıdır. Aşağıdaki Şekil 5, nanoya özgü tavsiyenin kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için kullanılabilecek bir karar ağacını göstermektedir veya nanomalzemenin özellikleriyle ilgili sonuçlar nedeniyle, bunun yerine ana rehber tarafından sağlanan tavsiyeler izlenebilir.



Şekil 5: İnsan sağlığı sonlanma noktaları için nanomalzeme testlerinde karar şeması

Ortaya Çıkan ve Yeni Tanımlanmış Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesi (SCENIHR), birçok nanomalzemenin önemli bir çözünürlüğe sahip olacağını ve "yaşayan sistemlerle etkileşim halinde olan bu malzemelerin, iyi tanımlanmış toksikolojik test prosedürlerinin ve yaklaşımlarının kullanımının gerçekleştirilebilmesi için yığın kimyasal maddeye yeterince yakın olduğunu" belirtir [86]. Nanomalzemelerin risk değerlendirmesine yönelik en son yaklaşımlar, suda çözünme hızı ve dengenin birincil anahtar unsur olduğu benzer bir strateji önermektedir [87]. Suda çözünürlük nanomalzemenin biyokalıcılığı ile ilgili ilk göstergesi verebilir [88]. Örneğin, mesleki ortamlarda risk değerlendirmesi açısından nanomalzemelerin biyokalıcılığının değerlendirilebilmesi için ilk pragmatik yaklaşım olarak BAuA [89], suda çözünürlüğü 100 mg/l'nin üzerinde olan nanomalzemelerin çözünür (yani biyokalıcı değildir) olarak kabul edilebileceğini öne sürmüştür⁵.

Suda çözünebilen nanomalzemeler genellikle biyolojik olarak kararlı değildir. Bununla birlikte, farklı biyolojik ortamlar hem çözünme kinetiğini hem de doyma konsantrasyonunu etkileyebilir [90]. Ek olarak, suda çözünmeyen bazı nanomalzemeler biyolojik sınırlarda biyolojik olarak kalıcı olmayabilir ve bu, çözünme hızı verilerinden değerlendirilebilir. Bir nanomalzemenin çözünürlüğü, zamana bağlı bir süreçtir (çözünme hızına ve yüzey alanına bağlı olarak) ve bir nanomalzemenin artan çözünme hızı ile azalan in vitro veya in vivo biyokalıcılığıyla doğrudan ilişkilidir [88]. Çözünme hızının, kesin bir kesme değerinin önerilmemiş olmasına rağmen çok hızlı olması gerekir (yani anında çözülmeye yakın) [87]. Çözünme hızının belirlenmesi, belirli bir tanecikğin biyolojik ortamı ile nasıl etkileşime girebileceğine dair fikir verir [91].

Sonuç olarak, ilgili biyolojik sınırlar ve test ortamlarındaki hızlı çözünme hızı kanıtına sahip nanomalzemeler için ana rehberde sağlanan tavsiyeler geçerlidir [92].

İlgili biyolojik sınırlar ve test ortamında hızlı çözünme hızına sahip olmayan nanomalzemeler için bu belgede daha fazla rehber sağlanmaktadır.

3.1.1.1 Test malzemesinin karakterizasyonu ve raporlanması

Toksikolojik testlerden önce, dağılım ve dozimetri ile ilgili özel hususlar dahil olmak üzere numunenin karakterizasyonu ve hazırlanışı İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenlik Testi için Numune Hazırlama ve Dozimetri üzerine OECD Rehberi'nde (ENV/JM/MONO(2012)40) ve bu Ek'in Bölüm 2.1.1'inde belirtildiği gibi gerçekleştirilmelidir. İmal edilen nanomalzemelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile test rehberleri hakkında OECD uzman toplantısının raporunda ek yararlı bilgiler bulunabilir (ENV/JM/MONO(2014)15). Test numunesinin uygun bir şekilde hazırlanması, verilerin karşılaştırılmasına ve daha sonra bu verilerin kullanılmasına olanak sağlayacaktır. Test malzemesinin karakterizasyonuna ilişkin bilgiler birden çok amaca hizmet eder:

- a) kimliğe (bu durumda dosyada kapsanan nanoformun) bağlanmasını sağlar ve bu nedenle veri uygunluğunu destekler,
- b) test sonuçlarının yorumlanmasını kolaylaştırır
- c) sonuçların elleçlenmesini/depolanmasını ve tekrarlanabilirliğini/yeniden üretilebilirliğini desteklemek için 'test numunesi olarak' malzemenin özellikleri hakkında genel bilgi sağlar ve
- d) bir maddenin nanoformlarının gruplandırılması veya nanoformlar arasında ve nanoformlar ile toplu form arasında çapraz okumayı gerektirenler için toksikolojik verilerin kullanımını kolaylaştırabilir (*Nicel Yapı Aktivite İlişkilerine ve Gruplamaya Uygulanabilen Nanomalzemelere İlişkin Daha Fazla Bilgi İçin Ek R.6-1'e bakınız [1]*).

Bu Ek'in Bölüm 2.1.1 ve 2.2'si, bu fiziko kimyasal parametrelerin toksikolojik testler için önemini ayrıntılı olarak açıklamakta ve ayrıca bu parametrelerin nasıl belirlenebileceğine dair bilgi vermektedir.

Nanomalzemelerin kimyasal bileşimi, fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik sistemlerle etkileşimi potansiyel zararlılığını etkiler. Nanoformlar da dahil olmak üzere bir kayıt kapsamındaki maddenin tüm olası formlarından kaynaklanan zararlılık, kayıt dosyasında sağlanan toksikolojik ve ekotoksikolojik bilgilerle ele alınmalıdır. Seçilen test malzemesinin/malzemesinin değerlendirilen maddeyi ve/veya nanoform(ları) temsil etmeye uygun olduğunu göstermek için, KKS'deki test malzemesi bilgileri alanı altında sonlanma noktası çalışma kaydında bazı bilgiler rapor edilmelidir. Aşağıdaki parametreler sağlanmalıdır:

⁵ Lütfen bu değer yalnızca biyokalıcılık için bir gösterge olarak kullanıldığını ve diğer bağlamlarda (çevresel sonlanma noktaları için çözünmezlikten feragat edilmesi gibi) çözünürlük/çözünmezlik için eşik değeri olarak kullanılmaması gerektiğini unutmayınız

- Kimyasal bileşim (KKDİK ve SEA kapsamında *maddelerin tanımlanması ve adlandırılmasına ilişkin Rehber* açıklandığı gibi)
- Boyut (minimum olarak D50, ancak tanecik boyutu dağılımı önerilir);
- Şekil ve en boy oranı;
- Yüzey kimyası

Ayrıca, Nicel Yapı Aktivite İlişkileri ve Kimyasalların Gruplandırılması [1] rehberine uygulanabilen nanomalzemeler için Ek R6-1, aynı maddenin nanoformları (ve nanoform olmayan) arasındaki zararlılık verilerinin kullanımının nasıl gerekçelendirileceğine dair bir yaklaşım sağlar. Rehberin ayrıntıları, mevcut zararlılık verilerinin bir maddenin farklı nanoformları için geçerli olup olmadığını değerlendirebilmek amacıyla gerekli olabilecek bazı (ek) parametreler sağlar. Test malzemesi karakterize edilirken kayıt ettirenin yukarıda bahsedilen rehberi takip edebilmesi için bu tür parametreleri dikkate alması gerekir. Örneğin, çözünme hızı, yüzey kimyası ve dağılılabilirlik, nanomalzemelerin gruplandırılması için bir temel olarak rapor edilmiştir [1].

3.1.1.2 Biyolojik Numune Alma ⁷

Şu anda, nanomalzemelerin insan sağlığı sonlanma noktaları⁶ için test edilebilmesi amacıyla özel olarak uyarlanmış bir OECD test rehberi bulunmamaktadır. Bununla birlikte bu belge, tamamen nanomalzemeye özgü olmasa da (örneğin akciğer aşırı yüklenmesi), nanomalzeme testi için özellikle önemli olan belirli yönler hakkında bazı ek öneriler vermeyi amaçlamaktadır.

İn vivo toksikolojik çalışmalarda toplanacak biyolojik numuneler, ilgili test rehberlerinde belirtilmiştir. Bununla birlikte, nanomalzemelerin OECD Test Rehberleri'nde listelenmeyen diğer dokulara dağıtılacağına dair bir gösterge varsa, bu ek dokuların toplanması önerilir.

Daha sonraki analizlerin (örneğin mikroskopi için kimyasal veya fiziksel dokunun sabitlenerek saklanması [94], yük analizi için dondurma ([95], [96]) performansına izin vermek için numunelerin saklanması tavsiye edilir .

3.1.1.3 Hayvansal Olmayan Test Yaklaşımlarının Kullanımı ⁷

KKDİK Yönetmeliği'nin 26. Maddesi, omurgalı hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen testlerin diğer tüm yollar tükendiğinde son çare olarak yapılması gerektiğini belirtir. Bu nedenle, omurgalıların kullanıldığı yeni herhangi bir test düşünülmenden önce, hayvanların kullanılmadığı zararlılık değerlendirme yöntemlerinden elde edilen verilere ve mevcut verilere bakma zorunluluğu vardır. Kayıt ettirenlerin, hayvan testine alternatifler için OECD ve Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı'nın (EURL ECVAM) devam eden gelişmeleri ile doğrulama çabaları ve ayrıca ÇŞB tarafından yeni yöntemlerin yasal kabulü hakkında bilgi sahibi olmaları tavsiye edilir [97]. Nanomalzemeler için hayvan dışı yaklaşımların uygulanması gruplama, çapraz okuma ve nicel yapı-aktivite ilişkileri (Nicel Yapı Aktivite İlişkileri) için kritik bir gereklilik olan bağlama özgü nanomalzeme karakterizasyonu dahil olmak üzere mevcut tüm bilgilerin önceden değerlendirilmesini gerektirir. Ayrıca, ilgili ve tekrarlanabilir in vitro sistemler kullanılabilir. Nanomalzemelere özgü Olumsuz Etki Oluşum Yolları (AOP'ler), OECD'de geliştirme aşamasındadır ve bütünlük değerlendirilmeye yeni yaklaşımlar sunar.

⁶ OECD Test Rehberi 412 ve Test Rehberi 413'ün nanomalzemeler ile ilgili testlerini kapsayacak şekilde güncellemesi şu anda hazırlık aşamasındadır. Taslaklar (halka açık olduğunda), nanomalzemelerin test edilmesi konusunda bazı rehberler sağlayabilir.

⁷ Bu tavsiye, insan sağlığıyla ilgili tüm sonlanma noktaları için geçerlidir, yani yalnızca bu belgede nanoya özgü kaydı olanlar için geçerli değildir.

Nanomatemeryaller için test dışı verilerin kullanımı ile ilgili olarak, aşağıdaki hususların dikkate alınması gerekir:

- Nanomalzemeler için *in siliko* modellerin (örneğin Nicel Yapı Aktivite İlişkileri) kullanımı da henüz belirlenmemiştir. Bu nedenle, nanomalzemeler için bu modellerin insanlar için bir zararlılık değerlendirmesi türetmek amacıyla kullanılması bilimsel olarak gerektirilmeli ve yalnızca durum bazında uygulanmalıdır. Bununla birlikte, her durum için test dışı yöntemlerden elde edilen sonuçlar kanıt ağırlığı bağlamında yararlı bilgiler olabilir veya bir hayvan testinin planlanması için gerekli bilgileri sağlayabilir. Nanomalzeme kinetiği, nicel yapı aktivite ilişkilerini ve fizyolojik tabanlı farmakokinetik (PBPK) modelleri belirlemek için kullanılanlar gibi bir dizi *in siliko* modelleri nanomalzemeler için geliştirilmiştir ([98], [99], [100] [101], [102] [103]).
- Gruplama ve çapraz okuma yaklaşımlarının kullanılması, hayvanlar üzerinde test yapmadan önce dikkate alınması gereken başka bir adımdır. Bu bağlamda, aynı maddenin diğer (nano) 8 formlarına ilişkin veriler mevcut olduğunda, Kimyasalların Nicel Yapı Aktivite İlişkileri ve Gruplandırılmasına İlişkin Rehber'de [1] geçerli olan nanomalzemeler için ÇŞB Rehberi Ek R.6-1'in dikkate alınması tavsiye edilir. Farklı maddelerin (nano) formları arasında çapraz okuma ve/veya gruplandırma ile ilgili olarak, Nicel Yapı Aktivite İlişkileri ve Kimyasalların Gruplandırılmasına ilişkin ÇŞB Rehberi Bölüm R.6'da [104] ve nanoya özgü ekinde [1] sağlanan tavsiyeler dikkate alınabilir.

3.1.1.4 *İn vitro* çalışmalar

KKDİK Yönetmeliği, Madde 14(1) uyarınca, "Maddelerin kendine özgü özelliklerine ilişkin bilgiler, Ek 11'de belirtilen koşulların karşılanması şartıyla, test dışı yöntemlerle üretilebilir". Bir hayvan testi gerçekleştirilmeden önce *in vitro* testlerden elde edilen bilgiler her zaman dikkate alınmalıdır.

Nanoya özgü parametreler düşünüldüğünde birçok *in vitro* analizin (ör. [105], [106], [107]) nanomalzemelere uygulanabilir olduğu ve kanıt ağırlığı yaklaşımının bir parçası olarak etkili bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir [2], [108], [109]. KKDİK, Ek 11, *in vitro* çalışmalardan gelen verilerin kabulü için hükümler içerir.

OECD 43'e [110] göre *in vitro* test için "Malzemelerin karakterizasyonu hem uygulamanın başlangıcında hem de metodolojilerin mevcut olduğu yerlerde uygulamadan sonra kullanılan hücrenin kültür ortamında yapılmalıdır. Nanomalzemelerin bir hücre kültürü ortamına uygulanmasındaki amaç, *in vivo* sistem içindeki biyolojik ve fizyolojik koşullarla mümkün olduğu ölçüde karşılaştırılabilir koşullar yaratmaktır".

3.1.2 Teste girişimin dikkate alınmasıyla ilgili tavsiye notu

Çeşitli nanomalzemelerin zaman zaman hücresel veya toksik etkilerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan birkaç teste girişim yaptığı bulunmuştur. Örneğin, bazı nanomalzemeler kolorimetrik veya florometrik deneylerin soğurmasına veya ışınımına katkıda bulunabilir. Ek olarak, geniş yüzey alanlarından dolayı nanomalzemeler, substratlar (örneğin, MTT 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-2H-tetrazolyum bromür içindeki reaktif ile CNT deneyleri [111]; veya ölçülen biyobelirteçler, (örneğin; laktat dehidrojenaz (LDH) ve siyokin proteinleri, örnek için [112]'ye bakınız). Kaplamalar veya safsızlıklar gibi diğer faktörlerin de test üzerinde etkisi olabileceğini lütfen unutmayınız.

Yaygın olarak kullanılan testlerde potansiyel girişim kaynaklarının özet listesi, Kroll ve arkadaşları [113] tarafından geliştirilmiştir ve aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

⁸ (Nano)form terimi, nanoformu olan ve nanoformu olmayan maddeleri kapsamayı amaçlamaktadır.

Tablo 12: Yaygın olarak kullanılan testlerde potansiyel etkileşim kaynakları

Sitotoksosite testi	Tespit yöntemi	Nanotanicik etkileşimi	Değiştirilm iş okuma	Tanicik türü
Hücre canlılığı				
MTT	Mitokondriyal aktivitenin kolorimetrik tespiti	Substratın yüzeye tutunması	Azalmış hücre canlılığı belirteci	Karbon nanotanicikl eri
LDH	LDH salımının kolorimetrik tespiti	LDH inhibisyonu	Azalmış nekroz belirteci	Nanotanicikl eri içeren geçiş metali
Ek 5 / Propidyum iyodür	Fosfatidilserine maruz kalmanın florimetrik tespiti (apoptoz belirteci) DNA'nın propidyum iyodür boyaması (nekroz belirteci)	Ca ²⁺ tüketimi Boyanın yüzeye tutunması	Azalmış apoptoz belirteci Azalmış nekroz belirteci	Karbon nanotanicikl eri
Nötr Kırmızısı	Bozulmamış lizozomların kolorimetrik tespiti	Boyanın yüzeye tutunması	Azalmış hücre canlılığı belirteci	Karbon nanotanicikl eri
Kaspaz	Kaspaz-3 aktivitesinin florimetrik tespiti (apoptoz belirteci)	Kaspaz-3 inhibisyonu	Azalmış oksidatif stres belirteci	Karbon nanotanicikl eri
Stres cevabı				
Diklorofloresein (DCF) ()	ROS üretiminin florimetrik tespiti	Işınırılık sönümü	Azalmış oksidatif stres göstergesi	Karbon nanotanicikl eri
Yangısal cevap				

ELISA (enzime bağlı immün Emilimi tayini)	Sitokin salımının kolorimetrik tespiti	Sitokinin yüzeye tutunması	Azalmış sitokin konsantrasyonunun göstergesi	Karbon nanotanecikleri Metal oksit nanotanecikleri
---	--	----------------------------	--	--

Yukarıdaki listenin kapsamlı olmadığı ve test sonuçlarının inhibisyonu ile güçlendirilme potansiyelinin her zaman araştırılması gerektiği unutulmamalıdır. Aglomerasyon, dağılım ve/veya doz testin sonucunu etkileyebilir.

Yöntem, bazı standart metodolojiler dahilinde eklenmiş (spiked) kontrolün inhibisyonunu veya güçlendirilmesini test etmek için eklenmiş (spiked) numunenin (bilinen bir referansın/kontrol numunesinin eklenmesi) kullanılmasını gerektirir. Bu, ölçülen değer eklemenin (spike) ve numunenin kümülatif olması gerektiği beklenen değer ile karşılaştırılması sonucunda değerlendirilir.

Standart yöntemin gerekliliğine bakılmaksızın, test etkileşimi mümkün olan her yerde her zaman araştırılmalıdır; ancak bu her zaman mümkün olmayabilir. Ayrıca, bildirilen çalışmaların çoğunda girişimin değerlendirilmesi için testlerin yeterince kontrol edilip edilmediğini belirlemek mümkün değildir. Bu nedenle, etkileşimi değerlendirmeye yönelik başka yöntemler yoksa genel bir önlem olarak, çalışılan sonlanma noktasını veya etkiyi değerlendirmek için birden fazla testin kullanılması tavsiye edilir, genotoksisite sonlanma noktası için Landsiedel ve arkadaşları [114] tarafından tavsiye edilmesi buna örnektir. Test sonucunun inhibisyon veya güçlendirme potansiyeli çok sayıdaki test yöntemini etkileyebilir. Bazı nanomalzemeler için belirli durumlarda test etkileşimi potansiyeli tanımlanmıştır, örneğin karbon nanotüplerin MTT testini etkilediğinden şüphelenilmektedir [115] ve bu, MTT testini kullanan OECD Test Rehberi 431/EU B.40 İnsan Cildi Modeli testleri (EPISKIN™, EpiDerm™) gibi testlerde sorunlara neden olabilir.

Bununla birlikte, nanomalzeme tayininin etkileşimi hakkındaki bilgiler eksiktir ve bu nedenle bir tayinin geçerliliğini sağlamak için yukarıda bahsedilen kontrol eklemelerinin kullanımı gibi önlemler alınabilir.

Çok sayıdaki testte yanıltıcı sonuçlara neden olan etkileşim potansiyeli nedeniyle, bu tür bir girişim için test edilirken azami özen gösterilmelidir.

3.2 Bireysel sonlanma noktaları için özel tavsiye

3.2.1 Tekrarlı doz toksisitesi

Şekil 5'te nanomalzemeler için genel test stratejisinde vurgulandığı gibi, ilgili biyolojik sıvılar ve test ortamında hızlı çözünme hızına sahip olmayan nanomalzemelerin test edilebilmesi için bu belgede daha fazla rehber sağlanmaktadır. Az çözünür tanecikler (PSP) bu kategorinin bir parçasıdır.

Az çözünür tanecikler için, sıçan akciğeri yükü toksikolojik sonuçta dikkate alınması gereken önemli bir konudur ve bu nedenle bu bölümde özel bir bölüm (3.2.1.1) buna atıfta bulunmak için dahil edilmiştir. Lif benzeri tanecikler için makrofajların aşırı yüklenmesine ek olarak, fagositozun da toksisite testlerinde rol oynadığı öne sürülmüştür [116].

Tekrarlı doz toksisitesi için nanomalzemenin test stratejisi düşünüldüğünde (Bölüm 7.5.6) şu hususlara dikkat edilmelidir:

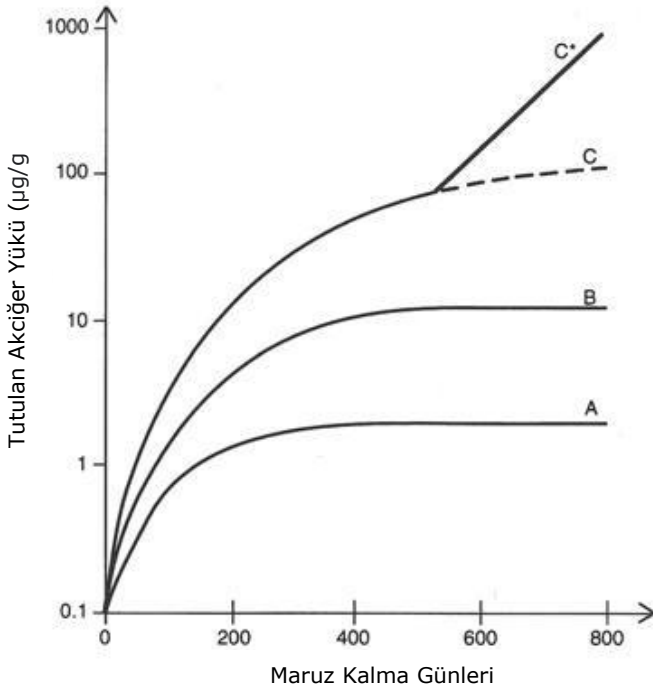
- Soluma, özellikle işçiler için (ve bazı durumlarda tüketiciler için (örneğin püskürtülebilir ürünler durumunda) nanotaneciklere, nano aerosollere ve toza maruz kalmanın en olası yolu olabilir. Bu nedenle, başka bir yolu doğrulayan ikna edici bilgilerin (örn. kullanımlar, çözünme hızı, vb.) olmadığı durumlarda tekrarlı doz toksisitesi çalışmalarının soluma yoluyla gerçekleştirilmesi tavsiye edilir. OECD Test Rehberi 412 ve 413'te ([117] ve [118]) açıklanan protokollerin herhangi bir değişikliği gereklendirilmelidir;

- Az çözünür tanecikler için doz aralığı bulma çalışmaları veya tekrarlı doz çalışmaları gerçekleştirildiğinde, *Bölüm R7c Sonlanma noktası özel rehberine uygun nanomalzemeler için Ek R7-2'de* açıklandığı üzere ek toksikokinetik verilerin toplanması önerilir. Ayrıca, testten tam olarak yararlanabilme konusunda belirli bir endişe varsa, bunun çalışma tasarımı içinde ele alınması önerilir (örn. birikim, belirli organ toksisitesi, vb.)
- Az çözünür tanecikler için bir soluma testi gerçekleştirirken, akciğerin aşırı yüklenmesi olasılığı dikkate alınmalıdır. Akciğer yükü ve klirensi hakkındaki veriler çapraz okuma bağlamında faydalı savunmalar olabilir.
- Az çözünür taneciklerin vücuttaki davranışını ve etkilerini izlemek için, numunelerin birkaç zaman noktasında ve/veya farklı organlardan alınması tavsiye edilir. Aralık bulma çalışmalarından elde edilen veriler, kapsamlı oldukları kanıtlandığında uygun numune alma zamanlarını belirlemek için kullanılabilir. Burada ek analizler için fazladan hayvan kullanımı konusunda tavsiyede bulunmak amaçlanmamaktadır. Bununla birlikte, ek analizler yapmakla toksisite göstergesi arasında bir denge bulmak önemlidir.
- Alt solunum yolunun (yani alveoller) birincil birikme bölgesi (aglomerat boyutuna bağlı olarak) olması ve solunan nanotaneçikler için alıkonmanın olması sebebiyle, bronkoalveoler lavaj (BAL) analizi pulmoner inflamasyonun ve hasarın öngörülebilmesi ve nicel olarak tahmin edilebilmesi için yararlı bir tekniktir (BAL parametreleri ile ilgili daha fazla bilgi için lütfen OECD Test Rehberleri 412 ve 413'e bakınız [117] [118]). Bronkoalveoler lavaj analizi, alveoler hasarın doz-cevap ve zaman süreci ile ilgili değişikliklerinin uygun şekilde araştırılmasına izin verir. Bu nedenle, nanomalzeme testleri için bronkoalveoler lavaj analizinin dahil edilmesi şiddetle tavsiye edilir (daha fazla ayrıntı BG ve KGD Rehberi (Sonlanma noktası özel rehberi) , Bölüm R7.a'da ve Bölüm R.7.5'te (tekrarlı doz toksisitesi) verilmiştir [92]).
- Birden fazla farklı doz tanımlayıcısı ölçütünün kullanılması ve kütle ölçütünün dahil edilmesi şiddetle tavsiye edilir. Tercih edilen yöntem(ler)in seçimi, Bölüm 3.2.1.1.1'de açıklandığı gibi gerekçelendirilmelidir.

3.2.1.1 Soluma toksisitesi değerlendirmesinde akciğer yükünün dikkate alınmasıyla ilgili tavsiye notu

Bu bölüm, az çözünür taneciklerin sıçan akciğeri yükü kavramını ve ilgili etkilerini, türler arasındaki farklılıkları ve sonuçlarının insanlara uyarlanmasını, ilgili doz ölçümlerini ve önerilen eşikleri açıklamaktadır. İnsanlarda risk değerlendirmesi bağlamında akciğer yükünü yorumlarken dikkatli olunmalıdır. Solunum yoluyla az çözünür taneciklere maruz kalan hayvanlarda gözlenen akciğer etkilerinin, aksi açıkça kanıtlanamadığı sürece insanlar için geçerli olduğu düşünülmelidir. Yeni bir çalışma tasarlanırken, tekrarlı doz soluma çalışmalarında kullanılacak dozlar maksimum tolere edilen dozu aşmamalıdır. OECD Test Rehberleri 412 [117] ve 413 [118], kullanılacak dozajlar hakkında tavsiyelerde bulunur. Bu, en yüksek dozun hayvanlarda aşırı strese neden olmadan veya onların yaşam süresini etkilemeden kesin toksisiteye yol açması hükmünü içerir.

Sıçanlarda gerçekleştirilen soluma çalışmalarından elde edilen sonuçlar, akciğer klirensi mekanizmalarının malzemelerin aynı anda veya verilen dozun olduğundan daha yüksek bir oranda giderilememesi nedeniyle, az çözünür taneciklerin malzeme birikimine bağlı olarak yüksek konsantrasyonlarda solunduğunda ciddi seviyede olumsuz pulmoner etkilere neden olabileceğini göstermiştir. "Akciğerin aşırı yüklenmesi" olarak adlandırılan bu durum, akciğerde tutulan tanecik yükünün belirli bir eşiği aşması sonucunda ortaya çıkar [119]. "Akciğerin aşırı yüklenmesi" terimi, az çözünür taneciklere maruz kalma ile ilişkili bir durumdur ve akciğerdeki bir taneciğin eşiğine ulaşıldığında ortaya çıkar. Sıçanlar az çözünür taneciklere uzun süre maruz bırakıldığında taneciklerin akciğer yükü, Şekil 6'da A, B ve C eğrileriyle gösterildiği üzere tanecik birikimi ve klirensi arasında bir dengeye ulaşılana kadar artar [120]. Bu dengeye çok hızlı ulaşabileceği gibi günler de sürebilir. Akciğer aşırı yüklenmesi eşiğinin altında, tanecikler normal mekanizmalar yoluyla sabit bir klirens hızında temizlenir, genel olarak çok az veya sadece küçük, tersinir bir yanıt oluşturur (A ve B eğrilerinde maruz kalma konsantrasyonları).



Şekil 6: Tutulan akciğer yükü ile akciğer aşırı yüklenmesi olgusuna yol açan maruz kalma süresi arasındaki ilişkinin şematik temsili A, B ve C eğrileri, giderek artan maruz kalma dozları ile ilişkilidir. Maruz kalma seviyesi yeterince yüksekse ve maruz kalma süresi yeterince uzunsa, taneciklerin alveoler makrofaj aracılı klirensi baskılanabilir. Bu meydana geldiğinde, tutulan akciğer yükü, daha fazla maruz kalma ile doğrusal olarak artar (C* eğrisi). [120]'den alınmıştır.

Eşiğe ulaşıldığında, akciğerin klirens mekanizmaları aşırı yüklenir. Bu, alveoler makrofajların hareketlilik kaybına bağlı olarak alveoler makrofaj (AM) aracılı toz gideriminde bir bozulmayı yansıtan, derin akciğerden tanecik klirensinde aşamalı bir azalma ile karakterize edilir [119]. Bu, Şekil 6'nın C* eğrisinde gösterilmektedir, burada eşik noktasında taneciğin alıkonması, bir dengenin kurulmasından ziyade doğrusal olarak meydana gelir (kesikli çizgi ile gösterildiği gibi).

Tanecik birikimindeki bu net artışın sonucu akciğer inflamasyonu, alveoler aracılı klirensin kesilmesi ve akciğer alveollerinde tanecik yüklü makrofajların ve/veya serbest (fagosite olmayan) taneciklerin birikimindeki bir artıştır. Sıçanlarda yangısal reaksiyonların granülomatöz tipe potansiyel ilerlemesinin maruz kalma süresi ve akciğerdeki tanecik (yüzey) yükü [121] seviyesine ve ayrıca hacimsel yüke [122] bağlı olduğu bulunmuştur.

Akciğer yüklenmesi durumu yaygın olarak sıçanların tekrar tekrar az çözünür taneciklere soluma yoluyla maruz kalmaları ile ilişkilidir, ancak az çözünür taneciklerin akciğere tek veya tekrarlı instilasyonundan sonra (doğrudan instilasyonun bir sonucu olarak yüksek birikim oranı nedeniyle) veya muhtemelen yoğun soluma yoluyla tekli maruz kalmanın sonucu olarak da meydana gelebilir [123]. Bu durum, solunabilir az çözünür taneciklerin nispeten yüksek maruz kalma seviyelerinde meydana gelmesi sebebiyle gözlemlenen yan etkilerin, deneysel koşulların neden olduğu akciğer yüklenmesinin bir ürünü olduğu ve taneciklerin inflamasyona, fibröze ve kansere neden olan içsel toksik potansiyeline doğru bir yansımanın olmadığı tartışılmaktadır. Oldukça reaktif veya toksik taneciklere maruz kalma, taneciklerin kendilerine özgü özelliklerinden dolayı daha düşük maruz kalma seviyelerinde (aşırı yüklenmenin olmadığı koşullar) inflamasyona, fibröze ve kansere neden olabilir.

Az çözünür tanecikler ile yapılan çalışmalarda, maruz kalma sonrası, belirli süre(ler)de akciğer yükündeki değişikliklerin ölçümü, akciğer klirensi hakkında önemli bilgiler sağlar ve maruz bırakılan tanecik miktarına karşı biriken miktarın netleştirilmesine izin verir. Dokudaki az çözünür taneciklerin yarı nicel bir değerlendirmesi için farklı görüntüleme teknikleri de kullanılabilir [124]. Biyokalicılığın bir göstergesi olarak çözünme potansiyelinin değerlendirilmesi in vitro sistemler kullanılarak da yapılabilir [91].

Klirens ve biyokalicılık hakkındaki bilgiler çapraz okuma ve kanıt ağırlığı bağlamında önemlidir.

Sıçan türü şu anda nanotanecikler için soluma toksisitesi testinde en hassas tür olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, sıçan çalışmalarında alveoler makrofajlardaki aşırı yüklenmeye dair bulguların yorumlanması zor olabileceğinden, sıçan akciğer yükünün ve bunun insanlarla ilişkisinin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır. Çeşitli çalışmalar, farklı türlerde akciğerin aşırı yüklenmesine verilen cevapları ve bu verilerin insanlar için uygunluğunu değerlendirmiştir. Örneğin sıçanların, farelerin ve hamsterlerin ultra ince dereceli titanyum dioksitin solunumuna karşı uzun süreli pulmoner cevabını değerlendiren karşılaştırmalı bir çalışmada [96], aynı hava konsantrasyonları sıçanlarda ve farelerde aşırı yük etkilerine neden olurken hamsterlerde bu etkiler görülmemiştir. Ayrıca, farelerdeki yangısal ve patolojik cevaplar sıçanlardakine göre daha az şiddetlidir ve benzer akciğer yüklerinden bağımsız olarak zamanla azalmıştır ([96], [125]). Bununla birlikte, insanlar için hayvan verilerinin ilgi düzeyi ile ilgili olarak diğer çalışmalar düşük toksisiteye sahip az çözünür taneciklerin yüksek akciğer yüklerine karşı akciğer yanıtlarının sıçanlarda ve insanlarda niteliksel olarak benzer olabileceğine işaret etmiştir [126]. Kömür madencilerinin maruz kalmasıyla ilgili deneyimlere dayanarak, belirli bir interstisyel tanecik sekestrasyonu ortamı varsayılmaktadır [127].

Borm ve arkadaşları [122] bu mekanizmanın, akciğerin aşırı yüklenmesi koşulları altında sıçanların aksine insanlarda neden yüksek akciğer kanseri riskine sahip olmadıklarını açıklayıp açıklayamadığını tartışmaktadır [122]. Yine de, kömür madencilerindeki bozulmuş klirens ile ilişkili taneciğin aşırı yüklenmesi için koşulları olan bazı kanıtların olduğu düşünülmektedir [122].

Bu nedenle, yüksek dozlarda az çözünür taneciklere maruz kaldıktan sonra elde edilen mevcut verilerin kullanımı, risk değerlendirmesi bağlamında ilgili olmadığı için otomatik olarak reddedilemez ve bu tür verilerin yorumlanmasına dikkatle yaklaşılmalıdır. Aşırı yük koşulları altında hayvanlarda görülen olumsuz etkilerin olması durumunda, insanlar için uygunluğun önceden varsayılması gerekir; insanlar için herhangi bir ilgisizlik iddiası verilerle desteklenmelidir.

Daha fazla bilgi için, tanecik birikimi, klirens ve akciğerin aşırı yüklenmesi üzerine derinlemesine bir tartışma sağlayan Miller [120] gibi akciğerin aşırı yüklenmesi konusunu kapsayan birkaç inceleme makalesi bulunmaktadır. Borm ve arkadaşları [128], risk değerlendirmesi bağlamında aşırı yüklenmenin önemini tartışırken, Borm ve arkadaşlarının [122] bir başyazısında akciğer tanecik aşırı yüklenmesi kavramları ile ilgili en son teknoloji özetlenmiştir. Bu incelemeler ayrıca akciğerin aşırı yükünün nasıl değerlendirileceği ve verilerin nasıl yorumlanacağı konusunda farklı görüşler sunmakta ve konunun hala tartışılmakta olduğu gerçeğini vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, solunum yoluyla az çözünür taneciklere maruz kalan hayvanlarda gözlenen akciğer etkilerinin, aksi açıkça kanıtlanmadığı sürece insanlar için geçerli olduğu düşünülmelidir.

3.2.1.1.1 Ölçütler

Akciğerde biriken doz ile sonraki inflamasyon ve bozulmuş klirens fonksiyonu arasındaki ilişkiyi en iyi hangi doz ölçüsünün tanımladığı sorusu özellikle önemlidir. Önerilen birkaç ölçüm vardır, ancak alveoler makrofajın hacimsel yükü ve yüzey alanı, akciğerin aşırı yüklenmesi ile ilişkili diğer yan etkilerin yorumlanmasında ve limit konsantrasyonlarının belirlenmesinde en uygun olanlardır [122]. Morrow ve arkadaşları [119], tanecik hacmi yaklaşık $60 \mu\text{m}^3/\text{AM}'\text{yi}$ aştığında (ortalama alveolar makrofaj hacminde % 6'lık bir artışa neden olur) aşırı yüklenmenin başladığını ve tanecik hacmi $600 \mu\text{m}^3/\text{AM}'\text{yi}$ (ortalama alveoler makrofaj hacminde % 60 artış sağlar) aştığında AM aracılı klirensin tamamen kesildiğini varsaymıştır. Morrow konseptini genişleten Pauluhn ([129], [130]), aglomera haline gelmiş az çözünür tanecikler için genel bir tanecik hacmi eşliğini modellemiştir.

Oberdoerster ve arkadaşları [131], taneciklerin yüzey alanının aşırı yüklenmeyi gecikmiş klirensle daha iyi ilişkilendirdiğini öne sürmüştür.

Çeşitli çalışmalar, taneciğin yüzey alanının akciğerde tetiklenen patojenik olaylarla iyi bir ilişki içinde olduğunu ileri sürmektedir ([128], [132], [73]). Sıçanlar üzerinde Tran ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada [73] az çözünür iki toz (titanyum dioksit ve baryum sülfat) içeren bir dizi kronik soluma deneyinden elde edilen veriler analiz edilmiştir. Sonuçlar, akciğer yükü tanecik yüzey alanı olarak ifade edildiğinde inflamasyon seviyesi ve lenf düğümlerindeki yer değiştirme (translokasyon) ile açık bir ilişki olduğunu göstermiştir. En yararlı olanı, yazarlar taneciklerdeki akciğer tepkisi için istatistiksel ilişkinin şekline bağlı olarak sıçanlarda "düşük toksisiteli tozlar" için yaklaşık 200-300 cm² akciğer yükündeki bir eşğin varlığını öne sürmüşlerdir.

Bazı çalışmalar kütleli akciğer aşırı yüklenmesinin daha az hassas bir göstergesi olarak gösterse de [133] kütle konsantrasyonu hala önemlidir, çünkü kütle bazlı ölçütü kullanan taneciklere maruz kalma ve toksisite hakkında çok sayıda veri ve araştırma mevcuttur. Bu nedenle, karşılaştırma(lar) için, kütle konsantrasyonu her zaman rapor edilmelidir.

Diğer çalışmalar ([134], [135]) nanotaneciklerin yüzeyindeki tanecik sayısının veya fonksiyonel gruplarının sayısının ([136], [137]) en iyi doz ölçüsü olduğunu bulmuştur.

En ilgili doz ölçüsü, söz konusu belirli nanotaneciğe bağlı olarak değişiyor gibi görünmektedir. Akciğerde biriken doz, aşırı yük koşulları ve sonraki patojenik etkiler arasındaki ilişkiyi en iyi tanımlayan doz ölçütünün oluşturulması ve risk değerlendirmesi için en uygun doz ölçütünün belirlenebilmesi için tanecik hacmi, yüzey alanları, kütle, tanecik sayısı ve fonksiyonel grup sayısı rapor edilmelidir.

Bu nedenle, ölçülen cevabın başka bir teste gerek kalmadan çoklu doz ölçümleriyle geriye dönük olarak ilişkilendirilebilmesi için test malzemelerinin tam olarak karakterize edilmesi çok önemlidir. Genel olarak, ne kadar çok ölçüm rapor edilirse o kadar iyidir.

Sonuç olarak, birden fazla farklı doz tanımlama ölçütünün kullanılması ve tercih edilen yöntemlerin seçiminin gerekçelendirilmesi şiddetle tavsiye edilir.

3.2.1.1.2 Akciğer yükü için tavsiyelere genel bakış

- Olumsuz etkileri gösteren yüksek doz seviyelerindeki az çözünür taneciklerle yapılan mevcut çalışmalardan elde edilen verilerin insanlarla ilgili olmaması sebebiyle bu veriler reddedilemez
- Yeni çalışmaları planlarken/uygularken aşırı yüksek dozların kullanımından (tolere edilen maksimum dozu aşmamak için) kaçınılmalıdır
- Akciğer yükü verileri, pulmoner (tutulan) dozun yanı sıra klirens davranışı hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir ve çapraz okuma ile kanıt ağırlığı yaklaşımlarını destekleyebilir.
- En ilgili ölçüt kullanılmalı ve kütle ölçütü her zaman dahil edilmelidir. Birden fazla ölçütün kullanılması şiddetle tavsiye edilir.

3.2.2 Mutajenite ve kanserojenite

3.2.2.1 Bakteriyel tayin etkileşiminin dikkate alınmasıyla ilgili tavsiye notu

Genotoksisite değerlendirmesi, genellikle genetik hasarla ilgili üç ana sonlanma noktasındaki etkilerin değerlendirilebilmesi için *in vivo/in vitro* etki ve gösterge testlerinin bir kombinasyonuna dayanır: gen mutasyonu, klastojenite ve anöploidi. Uluslararası ortak çalışmaların sonuçlarından ve değerlendirilen testler için mevcut olan geniş veri tabanlarından, tek bir testin tüm genotoksik maddeleri tespit edemeyeceği açıktır [138].

Bakteriyel ters mutasyon (Ames) testi (OECD Test Rehberi 471 [139]/EU B.12/13: Bakteriyel ters mutasyon testi (in vitro)) *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'deki nokta mutasyonlarını tespit eder ([140], [141]; [142]).

Nanomalzemeler ile ilgili olarak, genotoksisite testlerinin nanomalzemelere uygulanabilirliğinin gözden geçirilmesi, Ames testinin nanomalzemenin genotoksisitesini doğru bir şekilde temsil edip etmediğini incelemiştir [114]. Landsiedel çalışması [114], gözden geçirilen bu çalışmaların sonuçlarının ağırlıklı olarak negatif olduğunu bildirmiştir (5/6 çalışma). Grup, bazı nanomalzemelerin bakteri duvarını geçemeyeceğini, bazılarının ise bakterisidal oldukları için test organizmasını öldürdüğünü tahmin etmiştir. OECD 43 [110]'a göre, 'Ames testinin (Test Rehberi 471) kullanılması, nanomalzemelerin genotoksisitesinin araştırılması için önerilen bir test yöntemi değildir'. Benzer şekilde Doak ve arkadaşları [143] "Ames testi, kimyasalların analizi için güvenilir bir genotoksisite taraması olduğu halde nanomalzemelerin değerlendirilmesi için uygun görünmemektedir" sonucuna varmıştır.

Buna bağlı olarak, ilk taramadan sonra bu tür bakteriyel mutasyon testlerinden toplanan herhangi bir negatif verinin belki de mümkün olduğunca çok sayıdaki potansiyel genotoksik mekanizmaları kapsayan standartlaştırılmış genotoksisite testi yöntemlerinin uygulanması yoluyla diğer testlerle takip edilmesi tavsiye edilir. Diğer tayinlerin kullanımına ek olarak, hücresel alımın uygun yöntemlerle belirlenmesi *in vitro* genotoksisite tayinlerinin yorumlanmasına yardımcı olacaktır.

3.2.2.2 Mutajenite ve Kanserojenite için genel hususlar

Ana rehberin Bölüm 7.7'si mutajenite ve kanserojenite için genel test stratejisi sağlar. Ana rehberde verilen tavsiyeler, bu bölümde verilen tavsiyelerle birlikte takip edilmelidir.

Rehber, Tablo R.7.7-2'de mutajenite için in vitro test yöntemlerinin bir listesini verir ve liste, KKDİK Ek 7'de (Bkz. Bölüm 7.7.6.3) belirtildiği gibi in vitro gen mutasyonu çalışmasını içerir. Bakteriyel mutasyon testi, (nano)tanecik mutajenitesi için tek test olarak kullanılmamalıdır, bunun yerine, test yöntemi etkileşiminin neden olduğu karışık sonuçların ortaya çıkma potansiyelini azaltmak için bir dizi memeli hücresi gen mutasyon testiyle birlikte kullanılmalıdır. Hücresel alımın uygun yöntemlerle ölçülmesi, bakteriyel ve memeli hücresi genotoksitesisi/mutajenitesi testleri için şiddetle tavsiye edilir. Ayrıca, in vitro çalışmalarda metabolik aktivasyon sisteminin (S9) kullanılması testlerin sonucunu etkileyebilir: test edilen diğer herhangi bir kimyasalda olduğu gibi S9 da mutajenik metabolitlerin oluşumuna neden olabilir (nanomalzemenin metabolize edilebilmesi durumunda); ayrıca, proteinlerin eklenmesi (S9'da bulunan) nanomalzemelerin hücresel alımını değiştirebilir ([144], [143] ve [145])

Kasım 2013'te Ottawa, Kanada'da Üretilen Nanomalzemelerin Genotoksitesisi üzerine OECD/WPMN uzman toplantısında [110], nanomalzemelerin genetik toksitesisi testinin araştırılması için birkaç fikir birliği beyanı kabul edilmiştir ve yararlı bulunmuştur. Bu önerilerin birçoğu diğer bilimsel literatürlerde de desteklenmektedir (örneğin, Magdolenova ve arkadaşları [144], Pfuhler ve arkadaşları [145], Doak ve arkadaşları [143] tarafından yapılan incelemelere bakınız):

1. "Ames testinin (Test Rehberi 471 [139]) kullanılması, nanomalzemelerin genotoksitesisinin araştırılması için önerilen bir test yöntemi değildir" [110]

Son tartışmalara göre, memeli hücrelerinde 8.4.3'e göre gerekli olan memeli hücresindeki gen mutasyon testi (OECD Test Rehberi 476 [146] veya 490 [147]) gibi başka bir in vitro mutajenite çalışmasının yapılması önerilmektedir. Bununla birlikte, bakterilerde in vitro gen mutasyonu çalışması, potansiyel olarak önemli düzenleyici sonuçları olan Ek 7, 8.4.1 için bir veri gerekliliğidir (örneğin in vivo test takibi). Bu nedenle Ames testindeki negatif bir sonuç, yalnızca bakteri duvarı geçirgenliğinin kanıtının varlığında ve nanomalzeme tarafından bakteriyel aktivitenin yokluğunda geçerli kabul edilmelidir.

2. "Test rehberlerinde açıklanan hücre çoğalmasına bağlı sitotoksitesite ölçümleri, nanomalzemelerin in vitro testleri için uygulanacak en yüksek konsantrasyonun belirlenmesi için uygundur. Bazı durumlarda, herhangi bir potansiyel konsantrasyon-cevap ilişkisinin iyi karakterize edilmesini ve sitotoksitesite ile ilişkili olmayan konsantrasyonlarda olmasını sağlamak için standart $\sqrt{10}$ 'dan daha geniş konsantrasyon aralığının dikkate alınması uygundur." [110]
3. "Hücresel alımın kapsamı, test sonuçlarını yorumlarken dikkate alınması gereken kritik bir faktördür. Bazı durumlarda, bir memeli hücresindeki alım eksikliği genotoksitesite açısından düşük bir içsel zararlılığa doğrudan işaret edebilir". [110]

Hücre alımının önemi, EU Nanogenotox projesi tarafından da belirtilmiştir (http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/nanogenotox_web.pdf). Çeşitli parametreler (örneğin diğerlerinin yanı sıra aglomerasyon ve protein kaplama) hücre alımını etkileyebilir.

4. "Test rehberleri programı, hücre kültürü sisteminin sitokalazin B içermeyen nanomalzemeye maruz kalma süresinin sağlanması için, sitokalazin B'nin kullanıldığı yerlerde, uygulama sonrasında veya gecikmiş ortak uygulama protokolünün kullanılması sonucunda eklenmesini önermek için in vitro mikronükleus testinin modifikasyonunu dikkate almalıdır". [110]

KKDİK, Ek 8, 8.4.2'ye göre, bir mikronükleus testi (OECD Test Rehberi 487 [148]) veya bir kromozom bozukluğu testi (OECD 473 [149]) gereklidir. EU Nanogenotox projesi, "In vitro memeli hücreleri mikronükleus testi (OECD Test Rehberi 487) kimyasalların test edilmesine yönelik rehberin nanomalzemeler için geçerli olduğunu ancak in vivo tahmin sonuçları sağlamak için bazı uyarlamalara ihtiyaç duyabileceğini" göstermiştir [110] (http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/nanogenotox_web.pdf). Nanomalzeme testleri için in vitro memeli hücreleri mikronükleus testinin (Test Rehberi 487 [148]) adaptasyonu üzerine bir proje 2015 yılında OECD WPMN döner sermaye çalışması planında (Proje 4.95: Nanomalzemelerin Test Edilmesi için Genotoksisite Test Rehberlerine Bağlı İn Vitro Memeli Hücreleri Adaptasyonu Üzerine Rehber Doküman) onaylanmıştır. Çalışma, nanomalzemelerin fiziko-kimyasal karakterizasyonuna ve protokol modifikasyonlarına (alım mekanizmalarına göre hücre türünün seçimi, sitokalsin B kullanımı, nanomalzemelere maruz kalma zamanlaması, kontrollerin özellikleri, doz aralıkları ve doz ölçümleri) odaklanmaktadır.

5. *"Bir in vivo genotoksisite çalışması yürütmeden önce, nanomalzemenin hedef dokuya ulaşmış olup olmadığını belirlemek için bazı toksikokinetik araştırmalara ihtiyaç vardır, burada hedef doku temas alanı değildir. Aksine, verinin bulunmadığı bir durumda nanomalzemenin hedef dokuya ulaşmaması halinde birincil genotoksisitenin belirlenebilmesi için test uygulanamaz."* [110]
6. Hedef dokunun/dokuların sistemik mevcudiyetini ve/veya maruz kalmasını gösteren toksikokinetik bilginin yokluğunda, temas doku(lar) bölgesindeki genotoksik etkilerin araştırılması önerilir. *"Bir uygulama yolunun diğeri uygulama yoluna önerilmesi için yeterli veri bulunmamaktadır. Test için uygulama yolunun seçilmesinin temeli, insanların maruz kalması/maruz kalmaları için en uygun yolun dikkate alınması olmalıdır."* [110]

Şu anda soluma, insanların, özellikle de işçilerin (Bkz. R.7.a, Bölüm R.7.5.6), nanomalzemelere maruz kalması ile ilgili en olası yol olarak kabul edilmektedir. Seçilen uygulama yolu gerekçelendirilmelidir (ve hedef dokuların maruz kalma sorunu ele alınmalıdır).

Ek 1. Nanomalzemeler için davranış modelleri

Nanomalzemelerin davranışını değerlendirmek için modelleme araçlarının araştırılması ve geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Aşağıdaki Tablo 13'te verilen yöntemlerin listesi kapsamlı değildir ve nanomalzemelerin bağlanma kararlılığı ile çözünme hızına bağlı yöntemleri içerir. Nanomalzemelerin ortamdaki ve organizmalardaki davranışını ve taşınmasını tahmin etmek için kullanılabilir bu yöntemler hakkında daha fazla bilgi, örneğin [150]'de bulunabilir.

Modeller ve doğrulama durumları hakkındaki daha fazla bilgi, her model için referans olarak verilen yayınlarda bulunabilir.

Tablo 13: Nanomalzemelerin davranışı için bazı modellere genel bakış

Model	Genel bakış	Çıktılar	Model araçları ile ilgili bağlantı	Referanslar
SimpleBox4nano (SB4N): Klasik multimedya kütle dengesi modelleme sistemi	Model; agregasyon, bağlanma ve çözünme gibi çevresel ortamlarda (hava, su, toprak vb.) muhasebeleştirme süreçlerindeki tasarlanmış nanotaneciklerin (ENP) taşınmasını ve konsantrasyonlarını ifade eder. Model, eşzamanlı kütle dengesi denklemlerini çözer.	Çıktı, tasarlanmış nanotaneciklerin serbest dağılımlı türleri olarak kütle konsantrasyonları, doğal kolloidlerle heteroagregatlar ve zamana bağlı her ortamdaki ve kararlı durumdaki daha büyük doğal taneciklerdir.	http://www.rivm.nl/simplebox	[151]
NanoDUFLOW: Hem zamana hem ortama bağlı olarak açık hidrolojik model	Yerel akış koşulları ile homo ve heteroagregasyon, yeniden süspansiyon ve çöktürme gibi tasarlanmış nanotaneciklerin (tasarlanmış nanotanecikler) davranış süreçleri arasındaki geri bildirimler modellenmiştir.	Çıktılar, tasarlanmış tüm nanotanecik formlarının konsantrasyonları, uzay ve zamanda sudaki ve çökteltideki agregatlar ve alıkonmadır.	NanoDUFLOW alt modeli aracılığıyla kullanıcı tarafından tanımlanan bir dizi özel işlem içeren DUFLOW Modeling Studio (v3.8.7) yazılım paketi.	[152]
Denge durumu dağılımı modeli	Multimedya modeli, denge durumu dağılımını tahmin etmek için homoagregasyon, heteroagregasyon, çözünme ve çöktürme gibi nanoya özgü süreç tanımları kullanılarak geliştirilmiştir.	Çıktı, sudaki ve çökteltideki nanotanecik/kütle konsantrasyonları ve bu konsantrasyonların kaynağa olan uzaklığıdır.	Praetorius ve arkadaşları [26] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ilk vaka çalışması olarak bir nehir modeli kullanılmıştır.	[26]

REFERANSLAR

- [1] ECHA, "Nicel Yapı Aktivite İlişkileri (QSAR) ve Gruplandırma Rehberine uygulanabilen nanomalzemeler için Ek R.6-1," [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>.
- [2] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenlik Testi için Numune Hazırlama ve Dozimetri Rehberi. İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenliği Üzerine Seriler No.36. ENV/JM/MONO(2012)40, "2012. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/science/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>.
- [3] ISO, "ISO 14887:2000. Numune hazırlama - Sıvılardaki tozlar için dağılım süreçleri," 2000. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.iso.org/iso/home.html>.
- [4] N. Hartmann, K. Jensen, A. Baun, K. Rasmussen, H. Rauscher, R. Tantra, D. Cupi, D. Gilliland, F. Pianella ve J.-M. Riego Sintes, "Techniques and protocols for dispersing nanoparticle powders in aqueous media – is there a rationale for harmonization? (Nanotanecek tozlarının sucul ortamda dağılabilmesi için teknikler ve protokoller - uyumlaştırma için bir gerekçe var mı?)," *Journal of Toxicology and Environmental Health*, Kısım B: Kritik İncelemeler, cilt 18, sayı 6, sayfa 299-326, 2015.
- [5] ISO, "ISO 10808:2010. Nanotechnologies -- Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing (Nanoteknolojiler - Soluma toksisitesi testi için soluma maruz kalma odalarındaki nanotaneceklerin karakterizasyonu)," 2010. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.iso.org/iso/home.html>.
- [6] OECD, "İmal edilen nanomalzemelerin test edilmesi için rehber el kitabı: OECD'nin sponsorluk programı. İlk revizyon: İmal edilen nanomalzemelerin güvenliği ile ilgili seriler, ENV/JM/MONO(2009)20/REV," 2009. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/science/nanosafety>.
- [7] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelere Uygulanabilirlikleri için OECD Test Rehberlerinin Ön İncelemesi. İmal edilen nanomalzemelerin güvenliği ile ilgili seriler, ENV/JM/MONO(2009)21," 2009. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/science/nanosafety>.
- [8] OECD, "Test ve Değerlendirme Üzerine OECD Serisi, No. 194. Kimyasalların gruplandırılmasına ilişkin rehber, ikinci baskı ENV/JM/MONO(2014)4", 2014. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmentnontestingmethodsegqsarandgrouping.htm>.
- [9] A. Jemec, A. Kahru, A. Potthoff, D. Drobne, M. Heinlaan, S. Böhme, M. Geppert, S. Novak, K. Schirmer, R. Rekulapally, Singh, V. Aruoja, M. Sihtmäe, K. Juganson, A. Käkinen ve D. Kühnel, "An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: Harmonising techniques for high quality data (Nano gümüş karakterizasyonu ve zararlılık tanımlamasının laboratuvarlar arası karşılaştırması: Yüksek kaliteli veriler için uyumlaştırma teknikleri)," *Environment International*, cilt. 87, s. 20-32, 2016.
- [10] V. Kestens, G. Roebben, J. Herrmann ve E. A. J., "Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material (Aday sertifikalı referans malzeme olarak bir silika - nanotanecek karışımının boyut analizindeki zorluklar)," *Journal of Nanoparticle Research*, cilt 18, sayı 171, 2016.
- [11] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenliği Üzerine Seriler - No. 40. Üretilen Nanomalzemelerin Ekotoksikolojisi ve Çevresel Davranışına Ekleme: Test Rehberleri. Uzman Toplantısı Raporu ENV/JM/MONO(2014)1/ADD," [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/science/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>.
- [12] K. Rasmussen, M. Gonzalez, P. Kearns, J. Riego Sintes, F. Rossi ve P. Sayre, "Review of achievements of the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials' Testing and Assessment Programme. From exploratory testing to test guidelines (İmal Edilen

- Nanomalzemelerin Test ve Değerlendirme Programı üzerine OECD Çalışma Grubunun başarılarının gözden geçirilmesi. Keşif testlerinden test rehberlerine), "Regulatory Toxicology and Pharmacology, cilt 74, s. 147–160, 2016.
- [13] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelerin Test Programı" [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm>.
- [14] EJ Petersen, SA Diamond, A. Kennedy, G. Goss, K. Ho, J. Lead, S. Hanna, N. Hartmann, K. Hund-Rinke, B. Mader, N. Manier, P. Pandard, E. Salinas ve P. Sayre, "Adapting OECD Aquatic Toxicity Tests for Use with Manufactured Nanomaterials: Key Issues and Consensus Recommendations (OECD Sucul Toksikite Testlerinin İmal Edilen Nanomalzemeler ile Kullanımı İçin Uyarlanması: Temel Konular ve Uzlaşma Önerileri)," *Environmental Science & Technology*, cilt 49, sayı 16, s. 9532–9547, 2015.
- [15] J. Cheng, E. Flahaut ve S. Cheng, "Effect of carbon nanotubes on developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos (Karbon nanotüplerin zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarının gelişimi üzerindeki etkisi)," *Environmental Toxicology Chemistry*, cilt 26, sayı 4, s. 708– 716, 2004.
- [16] M. Dobrovolskaia, B. Neun, J. Clogston, J. Grossman ve S. McNeil, "Choice of method for endotoxin detection depends on nanoformulation (Nanoformülasyona Bağlı Endotoksin Tespiti için Yöntem Seçimi)," *Nanomedicine*, cilt 9, sayı 12, sayfa 1847-1856, 2014.
- [17] ISO, "ISO 29701:2010. Nanotechnologies – Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems – Limulus amoebocyte lysate (LAL) test (Nanoteknolojiler - İn vitro sistemler için nanomalzeme numuneleri üzerinde endotoksin testi - Limulus amebosit lizat (LAL) testi)," 2010. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.iso.org/iso/home.html>.
- [18] C. Jones ve D. Grainger, "In vitro assessments of nanomaterial toxicity (Nanomalzeme toksisitesinin in vitro değerlendirmeleri)," *Advanced Drug Delivery Reviews (Gelişmiş İlaç Teslimi İncelemeleri)*, cilt 61, sayı 6, s. 438–456, 2009.
- [19] OECD, "Test No. 105: Suda Çözünürlük, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 1," [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1-physical-chemical-properties_20745753.
- [20] OECD, "Üretilen İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenliği Hakkında Seri - No. 62 Çözünürlüğün, Risk Değerlendirmelerinde Nanomalzemelerin Çevresel Davranışının Değerlendirilmesi için Yüzey Kimyasının Bir Fonksiyonu Olarak Kullanılmasına İlişkin Hususlar. ENV/JM/MONO(2015)44," 2015. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/science/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm>.
- [21] OECD, "Test ve Değerlendirme Üzerine OECD Serisi. No. 29. Sucul Ortamlarda Metallerin ve Metal Bileşiklerinin Dönüştürülmesi/Çözünmesi Hakkında Rehber Doküman. ENV/JM/MONO(2001)9," 2001. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/seriesontestingandassessmenttestingfor environmental fate.htm>.
- [22] A. Praetorius, N. Tufenkji, K.-U. Goss, M. Scheringer, F. von der Kammer ve M. Elimelech, "The road to nowhere: equilibrium partition coefficients for nanoparticles (Hiçbir yere giden yol: nanotanecikler için denge dağılımı katsayıları)," *Environmental Science: Nano*, cilt 1, ss. 317-323, 2014.
- [23] G. Cornelis, "Fate descriptors for engineered nanoparticles: the good, the bad, and the ugly (Tasarlanmış nanotanecikler için davranış tanımlayıcıları: iyi, kötü ve çirkin)," *Environmental Science: Nano*, cilt 2, ss. 19-26, 2015.
- [24] S. Ottofuelling, F. Von Der Kammer ve Hofmann, "Commercial titanium dioxide nanoparticles in both natural and synthetic water: comprehensive multidimensional testing and prediction of aggregation behavior (Hem doğal hem de yapay suda ticari titanyum dioksit nanotanecikleri: kapsamlı çok boyutlu testler ve agregasyon davranışının tahmini)," *Environmental Science and Technology*, cilt 45, s. 10045–10052, 2011.
- [25] S. Sørensen, R. Hjorth, C. Delgado, Hartmann, N.B ve A. Baun, "Nanoparticle ecotoxicity – physical and/or chemical effects? (Nanotaneciğin ekotoksitesi - fiziksel

- ve/veya kimyasal etkileri?)," *Integrated Environmental Assessment and Management*, cilt 11, sayı 4, s. 719–728, 2015.
- [26] A. Praetorius, M. Scheringer ve K. Hungerbühler, "Development of Environmental Fate Models for Engineered Nanoparticles—A Case Study of TiO₂ Nanoparticles in the Rhine River (Tasarlanmış Nanotanecikler için Çevresel Davranış Modellerinin Geliştirilmesi - Ren Nehri'ndeki TiO₂ Nanotaneciklerinin Bir Vaka Çalışması)," *Environmental Science & Technology*, cilt 46, sayı 12, s. 6705–6713, 2012.
- [27] OECD, "Farklı Sucul Ortamlarda Nanomalzemelerin Aglomerasyon Davranışı Üzerine Taslak Test Rehberi" [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-guidelines-for-comments-section3-degradation-and-accumulation.htm>.
- [28] CEN, "EN 481:1993. İşyeri atmosferleri - Havadaki taneciklerin ölçümü için boyut oranı tanımları," 1993. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [29] HSE, "Solunabilir ve içe çekilebilir tozların numune alımı ve gravimetrik analizi için genel yöntemler. MDHS 14/3," 2014. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.hse.gov.uk/pubns/mdhs/index.htm>.
- [30] ISO, "ISO 12141:2002. Sabit kaynak emisyonları - Düşük konsantrasyonlarda tanecikli maddenin (toz) kütle konsantrasyonunun belirlenmesi - manuel gravimetrik yöntem," 2002. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [31] ISO, "ISO 9096:2003. Sabit kaynak emisyonları - Tanecikli maddenin kütle konsantrasyonunun manuel olarak belirlenmesi," 2003. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [32] ISO, "ISO 14907:2005. Ortamın hava kalitesi - Askıda tanecikli maddenin PM_{2.5} kütle oranının belirlenmesi için standart gravimetrik ölçüm yöntemi," 2005. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [33] ISO, "ISO/TR 27628:2007. İşyeri atmosferleri - Ultra ince, nanotanecik ve yapılandırılmamış aerosoller - Soluma yoluyla maruz kalmanın karakterizasyonu ve değerlendirilmesi," 2007. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [34] ISO, "ISO/TR 12885:2008. Nanoteknolojiler - Nanoteknolojilerle ilgili mesleki ortamlarda sağlık ve güvenlik uygulamaları," 2008. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [35] ISO, "ISO 14488:2007. Tanecikli malzemeler - Taneciğin özelliklerinin belirlenmesi için numune alma ve numune ayırma," 2007. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [36] OECD, "Test No. 110: Tanecik Boyutu Dağılımı/Lif Uzunluğu ve Çap Dağılımları," 1981. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-1-physical-chemical-properties_20745753.
- [37] Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), "Havadaki lif sayısı konsantrasyonlarının belirlenmesi. Faz kontrast optik mikroskobu (membran filtre yöntemi) ile önerilen bir yöntem," Cenevre, 1997.
- [38] ISO, "ISO 13322-1:2004. Tanecik boyutu analizi - Görüntü analizi yöntemleri - Bölüm 1: Statik görüntü analizi yöntemleri," 2004. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [39] ISO, "ISO 13322-2:2006. Tanecik boyutu analizi - Görüntü analizi yöntemleri - Bölüm 2: Dinamik görüntü analizi yöntemleri," 2006. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [40] ISO, "ISO 13318-1:2001. Santrifüjlü sıvı çöktürme yöntemleriyle tanecik boyutu dağılımının belirlenmesi - Bölüm 1: Genel ilkeler ve rehberler" 2001. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [41] ISO, "ISO 13318-2:2007. Santrifüjlü sıvı çöktürme yöntemleriyle tanecik boyutu dağılımının belirlenmesi - Bölüm 2: Foto santrifüj yöntemi," 2007. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [42] ISO, "ISO 13318-3:2004. Santrifüjlü sıvı çöktürme yöntemleriyle tanecik boyutu dağılımının belirlenmesi - Bölüm 3: Santrifüjlü X-ışını yöntemi," 2004. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [43] ISO, "ISO 20998-1:2006. Akustik yöntemlerle taneciklerin ölçümü ve karakterizasyonu - Bölüm 1: Ultrason zayıflatma spektroskopisinde kavramlar ve

- prosedürler," 2006. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [44] ISO, "ISO TS 13762:2001. Tanecik boyutu analizi - Küçük açılı X-ışını saçılma yöntemi," 2001. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [45] CEN, "EN 13925-1:2003. Tahribatsız test etme. Polikristalin ve amorf malzemelerden X ışını kırınımı. Genel ilkeler," 2003. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [46] CEN, "EN 13925-2:2003. Tahribatsız test etme. Polikristalin ve amorf malzemelerden X ışını kırınımı. Prosedürler," 2003. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [47] CEN, "EN 13925-3:2005. Tahribatsız test etme. Polikristalin ve amorf malzemelerden X ışını kırınımı. Cihazlar," 2003. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [48] ISO, "ISO 22412:2008. Tanecik boyutu analizi - Dinamik ışık saçılımı (DLS)," 2008. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [49] ISO, "ISO 13321:1996. Tanecik boyutu analizi - Foton korelasyon spektroskopisi," 1996. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [50] ASTM, "ASTM E2490 - 09. Süspansiyondaki Nanomalzemelerin Tanecik Boyutu Dağılımının Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) ile Ölçülmesi için Standart Rehber," [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.astm.org/>.
- [51] G. Lövestam, H. Rauscher, G. Roebben, B. Sokull Kluttgen, N. Gibson, J.-P. Putaud ve H. Stamm, "Considerations on a definition of nanomaterial for regulatory purposes (Düzenleyici amaçlarla nanomalzemenin tanımı üzerine düşünceler). Referans Raporlar, Ortak Araştırma Merkezi, Avrupa Komisyonu," JRC, 2010.
- [52] L. Ma-Hock, A. O. Gamer, R. Landsiedel, E. Leibold, T. Frechen, B. Sens, M. Linsenbuehler ve B. van Ravenzwaay, "Generation and characterization of test atmospheres with nanomaterials (Nanomalzemeler ile test atmosferlerinin oluşturulması ve karakterizasyonu)," *Inhalation Toxicology*, cilt 19, sayı 10, ss. 833-848, 2007.
- [53] CEN, "EN 15051-2:2013. İşyerinde maruz kalma - Yığın malzemelerin tozluğunun ölçülmesi - Kısım 2: Döner tambur yöntemi," 2013. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [54] T. Schneider ve K. Jensen, "Combined single-drop and rotating drum dustiness test of fine to nanosize powders using a small drum (Küçük bir tambur kullanılarak ince ila nano boyutlu tozların birleştirilmiş tek damla ve döner tambur tozluluk testi)," *The Annals of Occupational Hygiene*, cilt 52, sayı 1, ss. 23-34, 2008.
- [55] CEN, "EN 15051-3:2013. İşyerinde maruz kalma - Yığın malzemelerin tozluğunun ölçülmesi - Kısım 3: Sürekli damlatma yöntemi," 2013. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [56] ISO, "ISO 15900:2009. Tanecik boyutu dağılımının belirlenmesi - Diferansiyel elektriksel hareketlilik," 2009. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [57] ISO, "ISO 28439:2011. İşyeri atmosferleri - Çok ince aerosollerin/nanoaerosollerin karakterizasyonu - Farklı elektriksel hareketlilik analizi sistemleri kullanılarak boyut dağılımı ve sayı konsantrasyonunun belirlenmesi," 2011. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [58] ISO, "ISO 9276-1:1998. Tanecik boyutu analizi sonuçlarının gösterimi - Bölüm 1: Grafik gösterimi," 1998. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/home.html>.
- [59] ISO, "ISO 9276-2:2001. Tanecik boyutu analizi sonuçlarının gösterimi - Bölüm 2: Ortalama tanecik boyutlarının/çaplarının ve tanecik boyutu dağılımlarından aralıklarının hesaplanması," 2001. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/home.html>.
- [60] CEN, "EN 15051-1:2013. İşyerinde maruz kalma - Yığın malzemelerin tozluğunun ölçülmesi - Bölüm 1: Gereklilikler ve test yöntemlerinin seçimi," 2013. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>.
- [61] S. Upton, D. Hall ve G. Marsland, *Aerosol Topluluğu Yıllık Konferansı*'nda "Some Experiments on Material Dustiness (Malzeme Tozluğunun Üzerine Bazı Deneyler)", Surrey, İngiltere, 1990.

- [62] ISO, "ISO 9276-6:2008. Tanecik boyutu analizi sonuçlarının gösterimi - Bölüm 6: Tanecik şekli ve morfolojisinin tanımlayıcı ve nicel temsili," 2008. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/home.html>.
- [63] P. Barrett, "The shape of rock particles, a critical review (Kaya taneciklerinin şekli, eleştirel bir inceleme)," *Sedimentology*, cilt 27, s. 291-303, 1980.
- [64] SCENIHR. (Ortaya Çıkan ve Yeni Tanımlanmış Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesi), "Scientific basis for the definition of the term nanomaterial (Nanomalzeme teriminin tanımı için bilimsel temel). Konsültasyon öncesi görüş, 6 Temmuz 2010.," 2010.
- [65] W. Kreyling, M. Semmler-Behnke ve Q. Chaudhry, "A complementary definition of nanomaterial (Nanomalzemenin tamamlayıcı bir tanımı)," *Nano Today*, cilt 5, sayı 3, s. 165-168, 2010.
- [66] R. Duffin, CL Tran, A. Clouter, DM Brown, W. MacNee, V. Stone ve K. Donaldson, "The importance of surface area and specific reactivity in the acute pulmonary inflammatory response to particles (Taneciklere akut pulmoner yangısal yanıtta yüzey alanının ve özgül reaktivitenin önemi)," *The Annals of Occupational Hygiene*, cilt 46, sayı 1, ss. 242-245, 2002.
- [67] R. Duffin, L. Tran, D. Brown, V. Stone ve K. Donaldson, "Düşük toksisitenin ve metal nanotaneciklerinin in vivo ve in vitro proinflammojenik etkileri: taneciğin yüzey alanının ve yüzey reaktivitesinin rolünün vurgulanması," *Inhalation Toxicology (Soluma Toksikolojisi)*, cilt 19, sayı 10, ss. 849-856, 2007.
- [68] T. Stoeger, C. Reinhard, S. Takenaka, A. Schroepel, E. Karg, B. Ritter, J. Heyder ve H. Schulz, "Instillation of six different ultrafine carbon particles indicates a surface area threshold dose for acute lung inflammation in mice (Farelerde akut akciğer inflamasyonu için bir yüzey alanı eşik dozunu gösteren altı farklı ultra ince karbon taneciğinin instilasyonu)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 114, sayı 3, ss. 328-333, 2006.
- [69] G. Oberdörster, E. Oberdörster ve J. Oberdörster, "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles (Nanotoksikoloji: ultra ince taneciklerin çalışmalarından gelişen yeni bir disiplin)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 113, s. 823-839, 2005.
- [70] D. Brown, M. Wilson, W. MacNee, V. Stone ve K. Donaldson, "Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines (Ultra ince polistiren taneciklerinin boyuta bağlı proinflammatuar etkileri: yüzey alanı için bir rol ve ultra incelerin geliştirilmiş aktivitesinde oksidatif stres)," *Toxicology and Applied Pharmacology*, cilt 175, sayı 3, s. 191-199, 2001.
- [71] K. Donaldson, X. Li ve W. MacNee, "Ultrafine (nanometer) particle mediated lung injury (Ultra ince (nanometre) tanecik aracılı akciğer hasarı)," *Journal of Aerosol Science*, cilt 29, ss. 553-560, 1998.
- [72] G. Oberdorster, J. Ferin, R. Gelein, S. Soderholm ve J. Finkelstein, "Role of the alveolar macrophage in lung injury studies with ultrafine particles (Ultra ince taneciklerle akciğer hasarı çalışmalarında alveoler makrofajın rolü)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 97, ss. 193-199, 1992.
- [73] C. Tran, D. Buchanan, R. Cullen, A. Searl, A. Jones ve K. Donaldson, "Inhalation of poorly soluble particles. II. Influence of particle surface area on inflammation and clearance (Az çözünür taneciklerin solunması. II. Tanecik yüzey alanının yangı ve klirens üzerindeki etkisi)," *Inhalation Toxicology*, cilt 12, ss. 1113-1126, 2000.
- [74] S. Brunauer, P. Emmett ve E. Teller, "Adsorption of gases in multimolecular layers (Çok molekülü katmanlarda gazların yüzeye tutunması)," *Journal of the American Chemical Society*, cilt 60, sayı 2, ss. 309-319, 1938.
- [75] ISO, "ISO 9277:2010. Gazın yüzeye tutunması ile katıların özgül yüzey alanının belirlenmesi - BET," 2010. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [76] ISO, "ISO 18757:2005. İnce seramikler (ileri seramikler, ileri teknik seramikler). Seramik tozlarının özgül yüzey alanının BET yöntemi kullanılarak gazın yüzeye tutunması ile belirlenmesi," 2005. [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://www.iso.org/standards.html>.
- [77] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenlik Testi için Numune Hazırlama ve Dozimetri Hakkında Ön Rehber Notları. İmal edilen nanomalzemelerin güvenliği ile

- ilgili seriler, ENV/JM/MONO(2010)25, " 2010. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd.org/>.
- [78] L. Barton, M. A. M. Therezien, J. Bottero ve M. Wiesner, "Theory and Methodology for Determining Nanoparticle Affinity for Heteroaggregation in Environmental Matrices Using Batch Measurements (Yığın Ölçümlerin Kullanılmasıyla Çevresel Matrislerde Heteroagregasyon için Nanotaneciğin Kararlılığının Belirlenmesine Yönelik Teori ve Metodoloji)," *Environmental Engineering Science*, cilt 31, sayı 7, ss. 421-427, 2014.
- [79] T. Kuhlbusch, C. Nickel, B. Hellack, S. Gartiser, F. Flach, A. Schiwy, H. Maes, A. Schäffer, L. Erdinger, S. Gabsch ve M. Stintz, "Fate and behaviour of TiO₂ nanomaterials in the environment, influenced by their shape, size and surface area (Şekilleri, boyutları ve yüzey alanlarından etkilenen ortamdaki TiO₂ nanomalzemelerinin durumu ve davranışı), Federal Çevre Ajansı (Umweltbundesamt), Rapor No. (UBA-FB) 001577," 2012, s. 166.
- [80] OECD, "Test No. 312: Toprak Sütunlarında Sızıntı, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 3," [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-3-degradation-and-accumulation_2074577x.
- [81] M. Kiser, P. Westerhoff, T. Benn, Y. Wang, J. Perez-Rivera ve K. Hristovski, "Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. (Titanium nanomalzemesinin atık su arıtma tesislerinden uzaklaştırılması ve boşaltılması)." *Environmental Science & Technology*, cilt 43, sayı 17, ss. 6757-6763, 2009.
- [82] M. Kiser, J. Ryu, H. Jang, K. Hristovski ve P. Westerhoff, "Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass (Nanotaneciklerin heterotrofik atık su biyokütlesine biyolojik olarak soğurması)," *Water Research*, cilt 44, sayı 14, s. 4105-4114, 2010.
- [83] M. Kiser, D. Ladner, K. Hristovski ve P. Westerhoff, "Environmental Science & Technology", *Nanomaterial transformation and association with fresh and freeze-dried wastewater activated sludge: implications for testing protocol and environmental fate (Nanomalzeme dönüşümü ve taze ve dondurularak kurutulmuş atık su aktif çamuru ile ilişkisi: test protokolü ve çevresel davranışı için çıkarımlar)*, cilt 46, sayı 13, s. 7046-7053, 2012.
- [84] B. Pan ve B. Xing, "Adsorption mechanisms of organic chemicals on carbon nanotubes (Organik kimyasalların karbon nanotüpler üzerindeki yüzeye tutunma mekanizmaları)," *Environmental Science & Technology*, cilt 42, sayı 24, s. 9005-9013, 2008.
- [85] N. Hartmann, L. Skjolding, S. Hansen, J. Kjølholt, F. Gottschalck ve A. Baun, *Environmental fate and behaviour of nanomaterials- New knowledge on important transformation processes- Environmental Project No. 1594 (Nanomalzemelerin çevresel durumu ve davranışı - Önemli dönüşüm süreçleri hakkında yeni bilgiler - Çevre Projesi No. 1594)*, Danimarka Çevre Koruma Ajansı., 2014.
- [86] (SCENIHR) Ortaya Çıkan ve Yeni Tanımlanmış Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesi, "Nanoteknolojilerin tasarlanmış ve beklenmedik ürünleriyle ilişkili potansiyel risklerin değerlendirilmesi için mevcut metodolojilerin uygunluğu," 2006. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_003b.pdf.
- [87] S. Dekkers, A. Oomen, E. Bleeker, R. Vandebriel, C. Micheletti, J. Cabellos, G. Janer, N. Fuentes, S. Vázquez-Campos, T. Borges, M. Silva, A. Prina-Mello, D. Movia, F. Nesslany, A. Ribeiro, P. Leite, M. Groenewold, F. Cassee, A. Sips ve arkadaşları "Towards a nanospecific approach for risk assessment (Risk değerlendirmesi için nanoya özgü bir yaklaşıma doğru)," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, cilt 80, s. 46-59, 2016.
- [88] J. Arts, M. Hadi, M. Irfan, A. Keene, R. Kreiling, D. Lyon, M. Maier, K. Michel, T. Petry, U. Sauer, D. Warheit, K. Wiench, W. Wohlleben ve R. Landsiedel, "A decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping) (Nanomalzemelerin gruplandırılması ve test edilmesi için karar verme çerçevesi (DF4nanoGrouping))," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, cilt 71, sayı 2, Ek, ss. S1-S27, 2015.
- [89] BAUA. Federal Mesleki Güvenlik ve Sağlık Enstitüsü. "İmal Edilen Nanomalzemeler.

- Tehlikeli Maddeler Hakkında Duyuru 527," [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.nanopartikel.info/en/news/365-german-federal-institute-for-occupational-safety-and-health-baua-publishes-new-announcement-527-bekgs-527-on-manufactured-nanomaterials>.
- [90] S. Misra, A. Dybowska, D. Berhanu, S. Luoma ve E. Valsami-Jones, "The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies (Nanotaneğin çözünmesinin karmaşıklığı ve nanotoksikolojik çalışmalarındaki önemi)," *Science of The Total Environment*, cilt 438, s. 225-232, 2012.
- [91] W. Utembe, K. Potgieter, A. Stefaniak ve M. Gulumian, "Dissolution and biodurability: Important parameters needed for risk assessment of nanomaterials (Çözünme ve biyolojik olarak dayanıklılık: Nanomalzemelerin risk değerlendirmesi için gerekli önemli parametreler)," *Particle and fibre toxicology*, cilt 12, sayı 11, 2015.
- [92] ECHA, "Bilgi gereklilikleri ve kimyasal güvenlik değerlendirmesi hakkında rehber doküman Bölüm R.7a: Sonlanma noktası özel rehberi," [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>.
- [93] J. Arts, M. Irfan, A. Keene, R. Kreiling, D. Lyon, M. Maier, K. Michel, N. Neubauer, TSU Petry, D. Warheit, K. Wiench, W. Wohlleben ve R. Landsiedel, "Case studies putting the decision-making framework for the grouping and testing of nanomaterials (DF4nanoGrouping) into practice (Nanomalzemelerin gruplandırılmasına ve test edilmesine yönelik karar verme çerçevesini (DF4nanoGrouping) uygulamaya koyan vaka çalışmaları).," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, cilt 76, ss. 234-261, 2016.
- [94] C. Mühlfeld, B. Rothen-Rutishauser, D. Vanhecke, F. Blank, P. Gehr ve M. Ochs, "Visualization and quantitative analysis of nanoparticles in the respiratory tract by transmission electron microscopy (Geçirimli elektron mikroskopisi ile solunum yolundaki nanotaneçiklerin görüntülenmesi ve nicel analizi)," *Particle and Fiber Toxicology*, cilt 4, sayı 1, 2007.
- [95] K. E. Levine, R. A. Fernando, M. Lang, A. Essader ve B. A. Wong, "Development and validation of a high-throughput method for the determination of titanium dioxide in rodent lung and lung-associated lymph node tissues (Kemirgen akciğerinde ve akciğerle ilişkili lenf düğümü dokularında titanyum dioksitin belirlenmesi için yüksek verimli bir yöntemin geliştirilmesi ve doğrulanması)," *Analytical Letters*, cilt 36, sayı 3, ss. 563-576, 2003.
- [96] E. Bermudez, J. Mangnum, B. Wong, B. Asgharian, P. Hext, D. Warheit ve J. Everitt, "Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles (Farelerin, Sıçanların ve Hamsterlerin Ultra İnce Titanyum Dioksit Taneciklerinin Subkronik Solunumuna Karşı Pulmoner Cevapları)," *Toxicological Sciences*, cilt 77, sayı 2, ss. 347-357, 2004.
- [97] ECHA, "Pratik rehber: Hayvan testine alternatifler nasıl kullanılır," [Çevrimiçi]. Mevcut: <https://echa.europa.eu/practical-guides>.
- [98] G. Bachler, N. von Goetz ve K. Hungerbühler, "A physiologically based pharmacokinetic model for ionic silver and silver nanoparticles (İyonik gümüş ve gümüş nanotaneçikleri için fizyolojik tabanlı bir farmakokinetik model)," *Int. J. Nanomedicine*, cilt 8, ss. 3365-3382, 2013.
- [99] Z. Lin, N. Monteiro-Riviere ve J. Riviere, "Pharmacokinetics of metallic nanoparticles (Metalik nanotaneçiklerin farmakokinetiği)," *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, cilt 7, sayı 2, sayfa 189-217, 2015.
- [100] Z. Lin, N. Monteiro-Riviere ve J. Riviere, "A physiologically based pharmacokinetic model for polyethylene glycol-coated gold nanoparticles of different sizes in adult mice (Yetişkin farelerde farklı boyutlardaki polietilen glikol kaplı altın nanotaneçikleri için fizyolojik temelli bir farmakokinetik model)," *Nanotoxicology*, cilt 10, sayı 2, ss. 162-172, 2016.
- [101] P. Hinderliter, K. Minard, G. Orr, W. Chrisler, B. Thrall, J. Pounds ve J. Teegarden, "ISDD: A computational model of particle sedimentation, diffusion and target cell dosimetry for in vitro toxicity studies (ISDD: İn vitro toksisite çalışmaları için taneçinin çöktürülmesi, difüzyonu ve hedef hücre dozimetrisinin hesaplamalı bir modeli)," *Particle and Fibre Toxicology*, cilt 7, sayı 1, ss. 1-20, 2010.

- [102] Y. Mu, F. Wu, Q. Zhao, R. Ji, Y. Qie, Y. Zhou, Y. Hu, C. Pang, D. Hristozov, J. Giesy ve B. Xing, "Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs (Nano-Nicel Tanecik Yapı İlişkileri aracılığıyla metal oksit nanotaneciklerinin toksik potansiyelinin öngörülmesi)," *Nanotoxicology*, cilt 10, sayı 9, ss. 1207-1214, 2016.
- [103] G. M. DeLoid, J. M. Cohen, G. Pyrgiotakis, S. V. Pirela, A. Pal, J. Liu, J. Srebric ve P. Demokritou, "Advanced computational modeling for in vitro nanomaterial dosimetry (İn vitro nanomalzeme dozimetrisi için gelişmiş hesaplamalı modelleme)," *Particle and Fiber Toxicology*, cilt 12, sayı 32, 2015.
- [104] ECHA, "Bilgi gereklilikleri ve kimyasal güvenlik değerlendirme hakkında rehber doküman Bölüm R.6: QSAR ve kimyasalların gruplandırılması" [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>.
- [105] M. Wiemann, A. Vennemann, U. G. Sauer, K. Wiench, L. Ma-Hock ve R. Landsiedel, "An in vitro alveolar macrophage assay for predicting the short-term inhalation toxicity of nanomaterials (Nanomalzemelerin kısa süreli soluma toksisitesini tahmin etmek için bir in vitro alveoler makrofaj deneyi)," *Journal of Nanobiotechnology*, cilt 14, sayı 16, 2016.
- [106] M. Kingston, J. C. Pfau, J. Gilmer ve R. Brey, "Selective inhibitory effects of 50-nm gold nanoparticles on mouse macrophage and spleen cells (50 nm'lik altın nanotaneciklerinin fare makrofajı ve dalak hücreleri üzerindeki seçici inhibe edici etkileri)," *Journal of Immunotoxicology*, cilt 13, sayı 2, 2016.
- [107] S. Petrache Voicu, D. Dinu, C. Sima, A. Hermenean, A. Ardelean, E. Codrici, M. Stan, O. Zărnescu ve A. Dinischiotu, "Silica Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Autophagy but Not Apoptosis in the MRC-5 Cell Line (Oksidatif Strese ve Otofajiye Neden Olan Fakat MRC-5 Hücre Çizgisinde Apoptoza Neden Olmayan Silika Nanotanecikleri)," *Int. J. Mol. Sci*, cilt 16, ss. 29398-29416, 2015.
- [108] SCCS, "Guidance on the Safety Assessment of Nanomaterials in Cosmetics (Kozmetikteki Nanomalzemelerin Güvenlik Değerlendirmesine İlişkin Rehber)," 2011.
- [109] ISO, "ISO/TR 16196:2016. Nanoteknolojiler - Tasarlanan ve imal edilen nanomalzemeler için numune hazırlama ve dozlama yöntemlerinin derlenmesi ve açıklaması," 2016.
- [110] OECD, "İmal Edilen Nanomalzemelerin Genotoksitesisi: OECD Uzman Toplantısı Raporu. İmal Edilen Nanomalzemelerin Güvenliği Üzerine Seriler No.43. ENV/JM/MONO(2014)34," 2014. [Çevrimiçi]. Mevcut: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en).
- [111] L. Belyanskaya, P. Manser, P. Spohn, A. Bruinink ve P. Wick, "The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes – cell interaction (Karbon nanotüpler için MTT indirgeme tayininin güvenilirliği ve sınırları - hücre etkileşimi)," *Carbon*, cilt 45, sayı 13, s. 2643–2648, 2007.
- [112] M. Davoren, E. Herzog, A. Casey, B. Cottineau, G. Chambers, H. Byrne ve F. Lyng, "In vitro toxicity evaluation of single-walled carbon nanotubes on human A549 lung 56 cells (İnsan A549 akciğer 56 hücreleri üzerinde tek duvarlı karbon nanotüplerin in vitro toksisite değerlendirme)," *Toxicology in Vitro*, cilt 21, sayı 3, s. 438–448, 2007.
- [113] A. Kroll, M. Pillukat, D. Hahn ve J. Schnekenburger, "Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges (Nanotaneciğin risk değerlendirmesinde mevcut in vitro yöntemler: Sınırlamalar ve zorluklar)," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, cilt 72, sayı 2, s. 370–377, 2009.
- [114] R. Landsiedel, M. Schulz, M. Kapp ve F. Oesch, "Genotoxicity Investigations on Nanomaterials: Methods, Preparation and Characterization Test Material, Potential Artifacts and Limitations - Many Questions, Some Answers (Nanomalzemeler Üzerine Genotoksitesite Araştırmaları: Yöntemler, Hazırlama ve Karakterizasyon, Test Malzemesi, Potansiyel Eserler ve Sınırlamalar - Birçok Soru, Bazı Cevaplar)," *Mutation Research*, cilt 681, sayı 2-3, s. 241–258, 2009.
- [115] J. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp ve H. Krug, "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays (Oops, yine yaptılar! Karbon nanotüpler, canlılık

- deneylerinde bilim insanlarını aldatıyor)," *Nano Letters*, cilt 6, sayı 6, s. 1261-1268, 2006.
- [116] K. Donaldson, F. Murphy, R. Duffin ve C. Polonya, "Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma (Asbest, karbon nanotüpler ve plevral mezotelyum: paryetal plevrada, inflamasyonda ve mezotelyomada uzun lif alıkonmasının rolü ile ilgili hipotezin gözden geçirilmesi)," *Particle and Fibre Toxicology*, cilt 7, sayı 5, 2010.
- [117] OECD, "Test No. 412: Subakut Solunma Toksikitesi: 28 Günlük Çalışma, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 2009. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-412-subacute-inhalation-toxicity-28-day-study_9789264070783-en.
- [118] OECD, "Test No. 413: Subkronik Solunma Toksikitesi: 90 Günlük Çalışma, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 2009. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-413-subchronic-inhalation-toxicity-90-day-study_9789264070806-en.
- [119] P. Morrow, "Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs (Akciğerlerin aşırı toz yüklenmesini açıklamak için olası mekanizmalar)," *Fundamental and Applied Toxicology*, cilt 10, sayı 3, ss. 369-384, 1988.
- [120] F. Miller, "Dosimetry of particles in laboratory animals and humans in relationship to issues surrounding lung overload and human health risk assessment: A critical review (Akciğerin aşırı yüklenmesi ve insan sağlığı risk değerlendirmesini kapsayan sorunlarla ilişkili olarak laboratuvar hayvanlarında ve insanlarda taneciklerin dozimetrisi: Kritik bir inceleme)," *Inhalation Toxicology*, cilt 12, ss. 19-57, 2000.
- [121] J. Keller, W. Wohlleben, L. Ma-Hock, V. Strauss, S. Gröters, K. Küttler, K. Wiench, C. Herden, G. Oberdörster, B. van Ravenzwaay ve R. Landsiedel, "Time course of lung retention and toxicity of inhaled particles: short-term exposure to nano-Ceria (Akciğer alıkonmasının zaman akışı ve solunan taneciklerin toksisitesi: nano-Ceria'ya kısa süreli maruz kalma)," *Archives of Toxicology*, cilt 88, sayı 11, ss. 2033-2059, 2014.
- [122] P. Borm, F. Cassee ve G. Oberdörster, "Lung particle overload: old school – new insights? (Akciğerde taneciğin aşırı yüklenmesi: geleneksel fikirlere sahip gruplar - yeni kavrayışlar?)," *Particle and Fibre Toxicology*, cilt 12, sayı 10, 2015.
- [123] J. Maulian, "Usefulness of animal models for predicting human responses to long-term inhalation of particles (İnsanların, taneciklerin uzun süreli solunmasına karşı verdiği cevapların tahmin edilebilmesi için hayvan modellerinin kullanışlılığı)," *Chest*, cilt 109, sayı 3, Ek, s. 65S-68S, 1996.
- [124] A. Ostrowski, D. Nordmeyer, A. Boreham, C. Holzhausen, L. Mundhenk, C. Graf, M. Meinke, A. Vogt, S. Hadam, J. Lademann, E. Rühl, U. Alexiev ve A. Gruber, "Overview about the localization of nanoparticles in tissue and cellular context by different imaging techniques (Nanopartiküllerin doku ve hücresel bağlamda farklı görüntüleme teknikleriyle lokalizasyonuna genel bakış)," *Beilstein Journal of Nanotechnology*, cilt 6, s. 263-280, 2015.
- [125] E. Bermudez, J. Mangnum, B. Asgharian, B. Wong, E. Reverdy, P. Hext, D. Warheit ve J. Everitt, "Long-term pulmonary response of three laboratory rodents to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles (Pigmentli titanyum dioksit taneciklerinin subkronik solunmasına üç laboratuvar kemirgeninin uzun süreli pulmoner cevabı)," *Toxicological Sciences*, cilt 77, sayı 2, s. 347-357, 2002.
- [126] E. Kuempel, M. Attfield, L. Stayner ve V. Castranova, "Human and Animal Evidence Supports Lower Occupational Exposure Limits for Poorly-Soluble Respirable Particles: Letter to the Editor re: 'Low-Toxicity Dusts: Current Exposure Guidelines Are Not Sufficiently Protective' by Cherrie, Brosseau, Hay and Donalds (Az Çözünür Solunabilir Tanecikler için Daha Düşük Mesleki Maruz Kalma Sınırlarını Destekleyen İnsan ve Hayvan Kanıtı: Editöre Mektup: 'Cherrie, Brosseau, Hay ve Donalds tarafından 'Düşük Toksikiteli Tozlar: Yeterince Koruyucu Olmayan Mevcut Maruz Kalma Rehberleri,'" *The Annals of Occupational Hygiene*, cilt 58, sayı 9, ss. 1205-1208, 2014.
- [127] D. Gregoratto, M. Bailey ve J. Marsh, "Modelling particle retention in the alveolar-interstitial region of the human lungs (İnsan akciğerlerinin alveoler-interstisyel

- bölgesinde tanecik alıkonmasının modellenmesi)," *Journal of Radiological Protection*, cilt 30, sayı 3, ss. 491-512, 2010.
- [128] P. Borm, R. Schins ve C. Albrecht, "Inhaled particles and lung cancer, part B: Paradigms and risk assessment (Solunan tanecikler ve akciğer kanseri, bölüm B: Paradigmalar ve risk değerlendirmesi)," *International Journal of Cancer*, cilt 110, sayı 1, ss. 3-14, 2004.
- [129] J. Pauluhn, "Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures (Sıçanların çok duvarlı karbon nanotüplere soluma yoluyla 13 haftalık subkronik maruz kalması: toksik etkiler, lifli yapıların değil aglomera yapılarının yoğunluğu ile belirlenir)," *Toxicological Science*, cilt 113, sayı 1, ss. 226-242, 2010.
- [130] J. Pauluhn, "Poorly soluble particulates: Searching for a unifying denominator of nanoparticles and fine particles for DNEL estimation (Az çözünür tanecikler: DNEL tahmini için nanotaneciklerin ve ince taneciklerin birleştirici paydasının aranması)," *Toxicology*, cilt 279, sayı 1-3, ss. 176-188, 2011.
- [131] G. Oberdorster, J. Ferin ve B. Lehnert, "Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury (Tanecik boyutu, in vivo tanecik kalıcılığı ve akciğer hasarı arasındaki ilişki)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 102 (Ek 5), ss. 173-179, 1994.
- [132] A. Elder, R. Gelein, J. Finkelstein, K. Driscoll, J. Harkema ve G. Oberdörster, "Effects of subchronically inhaled carbon black in three species. I. Retention kinetics, lung inflammation, and histopathology (Üç türde eşzamanlı olarak solunan karbon siyahının etkileri. I. Alıkonma kinetiği, akciğer inflamasyonu ve histopatoloji)," *Toxicological Sciences*, cilt 88, sayı 2, ss. 614-629, 2005.
- [133] D. Warheit, J. Hansen, I. Yuen, D. Kelly, S. Snajdr ve M. Hartsy, "Inhalation of high concentrations of low toxicity dusts in rats results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation (Farelerde düşük toksisiteli tozların yüksek konsantrasyonlarının solunması, pulmoner klerens mekanizmalarının bozulmasına ve kalıcı inflamasyona neden olur)," *Toksikoloji ve Uygulamalı Farmakoloji*, cilt 145, sayı 1, ss. 10-22, 1997.
- [134] K. Wittmaack, "In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: Particle number, surface area, or what? (Nanotanecik maruz kalmasına akciğer yangısı cevabını ölçmek için en uygun parametrenin araştırılması: Tanecik sayısı, yüzey alanı veya ne?)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 115, sayı 2, ss 187-194, 2007.
- [135] K. Wittmaack, "Dose and Response Metrics in Nanotoxicology: Wittmaack Responds to Oberdoerster et al. and Stoeger et al. (Nanotoksikolojide Doz ve Cevap Ölçütleri: Wittmaack Oberdoerster ve arkadaşları ile Stoeger ve arkadaşları)," *Environmental Health Perspectives*, cilt 115, sayı 6, s. A291 – A292., 2007.
- [136] D. Warheit, T. Webb, V. Colvin, K. Reed ve C., "Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: Toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics (Sıçanlarda nano ölçekli ve ince kuvars tanecikleri ile akciğer biyotayini çalışmaları: Toksikite tanecik boyutuna değil, yüzey özelliklerine bağlıdır)," *Toxicological Sciences*, cilt 95, sayı 1, s. 270-280, 2007.
- [137] D. Warheit, T. Webb, K. Reed ve S. S. C. Frerichs, "Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties (Ultra ince TiO₂ taneciklerinin üç formuna sahip sıçanlarda pulmoner toksisite çalışması: Yüzey özellikleriyle ilgili farklı cevaplar)," *Toxicology*, cilt 230, sayı 1, s. 90-104, 2007.
- [138] D. Eastmond, A. Hartwig, D. Anderson, W. Anwar, M. Cimino, I. Dobrev, G. Douglas, T. Nohmi, D. Phillips ve C. Vickers, "Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme (Kimyasal risk değerlendirmesi için mutajenite testi: WHO/IPCS Uyumlaştırılmış Şema)," *Mutagenesis*, cilt 24, sayı 4, sayfa 341-9, 2009.
- [139] OECD, "Test No. 471: Bakteriyel Ters Mutasyon Testi, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 1997. [Çevrimiçi]. Mevcut: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-471-bacterial-reverse-mutation->

[test_9789264071247-en.](#)

- [140] B. Ames, J. McCann ve E. Yamasaki, "Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome (Salmonella/Memeli Mikrozomu ile Karsinojenleri ve Mutajenleri Tespit Etme Yöntemleri)," *Mutation Research*, cilt 31, sayı 6, s. 347-363, 1975.
- [141] D. Maron ve B. Ames, "Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test (Salmonella Mutajenite Testi için Gözden Geçirilmiş Yöntemler)," *Mutation Research*, cilt. 113, sayı 3-4, s. 173-215, 1983.
- [142] D. Gatehouse, S. Haworth, TGE Cebula, L. Kier, T. Matsushima, C. Melcion, T. Nohmi, S. Venitt ve E. Zeiger, "Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays (Bakteriyel Mutasyon Tayinlerinin Performansı için Tavsiyeler)," *Mutation Research*, cilt 312, sayı 3, ss. 217-233.
- [143] S. Doak, B. Manshian, G. Jenkins ve N. Singh, "In vitro genotoxicity testing strategy for nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines (Nanomalzemeler için in vitro genotoksosite test stratejisi ve mevcut OECD rehberlerinin uyarlanması)," *Mutation Research*, cilt 745, sayı 1-2, s. 104-111, 2012.
- [144] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone ve M. Dusinska, "Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles (Genotoksosite mekanizmaları. Tasarlanmış nanotanecikler ile in vitro ve in vivo çalışmaların bir incelemesi)," cilt 8, sayı 3, ss. 233-278, 2014.
- [145] S. Pfuhler, R. Elespuru, M. Aardema, S. Doak, E. Donner, M. Honma, M. Kirsch-Volders, R. Landsiedel, M. Manjanatha, T. Singer ve J. Kim, "Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification (Nanomalzemelerin Genotoksitesini : Zararlılık Tanımlaması için İyileştirme Stratejileri ve Testleri)," *Environmental and Molecular Mutagenesis*, cilt 54, sayı 4, s. 229-239, 2013.
- [146] OECD, "Test No. 476: İn vitro Memeli Hücreleri Gen Mutasyon Testi, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 1997. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-476-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-test_9789264071322-en.
- [147] OECD, "Test No. 490: Timidin Kinaz Geni Kullanılarak İn Vitro Memeli Hücreleri Gen Mutasyon Testleri, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 2015. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-490-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-tests-using-the-thymidine-kinase-gene_9789264242241-en.
- [148] OECD, "Test No. 487: İn Vitro Memeli Hücreleri Mikronükleus Testi, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 2010. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264091016-en.
- [149] OECD, "Test No. 473: İn vitro Memeli Kromozom Bozukluğu Testi, Kimyasalların Test Edilmesine Yönelik OECD Rehberleri, Bölüm 4," 1997. [Çevrimiçi]. Mevcut: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-473-in-vitro-mammalian-chromosome-aberration-test_9789264071261-en.
- [150] Y. Cohen, R. Rallo, R. Liu ve H. Liu, "In Silico Analysis of Nanomaterials Hazard and Risk (Nanomalzemelerin Zararlılığının ve Riskinin İn Siliko Analizi)," *Acc Chem Res.*, cilt 46, sayı 3, s. 802-812, 2013.
- [151] J. A. J. Meesters, A. A. Koelmans, J. T. K. Quik, A. J. Hendriks ve D. van de Meent, "Multimedia Modeling of Engineered Nanoparticles with SimpleBox4nano: Model Definition and Evaluation (SimpleBox4nano ile Tasarlanmış Nanotaneciklerin Çoklu Ortam Modellemesi: Modelin Tanımı ve Değerlendirilmesi)," *Environmental Science & Technology*, cilt 48, sayı 10, ss. 5726-5736, 2014.
- [152] J. T. Quik, J. J. de Klein ve A. A. Koelmans, "Spatially explicit fate modelling of nanomaterials in natural waters (Nanomalzemelerin doğal sularda mekansal olarak belirgin davranışının modellenmesi)," *Water Research*, cilt 80, s. 200-208, 2015.
- [153] ECHA, "Nanoformları kapsayan kayıt dosyaları nasıl hazırlanır: en iyi uygulamalar" [Çevrimiçi]. Mevcut: http://echa.europa.eu/documents/10162/13655/how_to_register_nano_en.pdf/f8c046ec-f60b-4349-492b-e915fd9e3ca0.

