

II

(Actes dont la publication n'est pas une condition de leur applicabilité)

COMMISSION

DIRECTIVE DE LA COMMISSION

du 25 avril 1984

portant sixième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses

(84/449/CEE)

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS
EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu la directive 67/548/CEE du Conseil, du 27 juin 1967, concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses ⁽¹⁾, modifiée pour la sixième fois par la directive 79/831/CEE du Conseil ⁽²⁾, et plus particulièrement ses articles 19, 20 et 21,

considérant que l'article 3 paragraphe 1 de la directive 79/831/CEE prévoit que la détermination des propriétés physico-chimiques de la toxicité et de l'écotoxicité des substances et préparations est pratiquée selon les méthodes prévues à l'annexe V;

considérant que l'article 19 de la directive 79/831/CEE, du 18 septembre 1979, prévoit que l'annexe V relève de la procédure du comité d'adaptation au progrès technique et qu'en particulier il convient de prendre en considération des méthodes reconnues et recommandées par les organismes internationaux compétents lorsque ces recommandations existent;

considérant que les dispositions de la présente directive sont conformes à l'avis du comité pour l'adaptation au progrès technique des directives visant à l'élimination

des entraves techniques aux échanges dans le secteur des substances et des préparations dangereuses,

A ARRÊTÉ LA PRÉSENTE DIRECTIVE:

Article premier

Le texte de l'annexe V à la directive 67/548/CEE est remplacé par le texte figurant en annexe à la présente directive.

Article 2

Les États membres adoptent et publient, avant le 1^{er} juillet 1985, les dispositions nécessaires pour se conformer à la présente directive et en informent immédiatement la Commission. Ils appliquent ces dispositions à partir du 1^{er} juillet 1986.

Article 3

Les États membres sont destinataires de la présente directive.

Fait à Bruxelles, le 25 avril 1984.

Par la Commission

Karl-Heinz NARJES

Membre de la Commission

⁽¹⁾ JO n° L 196 du 16. 8. 1967, p. 1.

⁽²⁾ JO n° L 259 du 15. 10. 1979, p. 10.

ANNEXE

La présente annexe expose les méthodes d'essai pour la détermination des propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques énumérées à l'annexe VII et à l'annexe VIII de la directive 79/831/CEE.

Ces méthodes sont basées sur les travaux et recommandations des organismes internationaux compétents [en particulier l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)].

Lorsque de telles méthodes n'existent pas, ce sont des standards nationaux ou des méthodes généralement reconnues dans les milieux scientifiques qui sont retenues. En règle générale, les essais doivent porter sur la substance telle qu'elle est commercialisée. L'incidence que peuvent éventuellement avoir les impuretés sur les résultats de l'essai ne doit pas être négligée.

Lorsque les méthodes de la présente annexe ne sont pas adaptées à l'examen d'une propriété donnée, le déclarant doit justifier l'emploi d'autres méthodes.

Les expérimentations et les études sur les animaux devront respecter les réglementations nationales et tenir compte des principes humanitaires ainsi que des derniers développements internationaux dans le domaine de la protection des animaux.

Entre diverses méthodes d'essai équivalentes, on choisit celle qui nécessite le plus petit nombre d'animaux.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
PARTIE A: Méthodes de détermination des propriétés physico-chimiques	4
A. 1. Point de fusion/intervalle de fusion	4
A. 2. Point d'ébullition/intervalle d'ébullition	13
A. 3. Densité relative	20
A. 4. Pression de vapeur	25
A. 5. Tension superficielle	37
A. 6. Hydrosolubilité	44
A. 7. Liposolubilité	53
A. 8. Coefficient de partage	57
A. 9. Point d'éclair	61
A. 10. Inflammabilité (solides)	63
A. 11. Inflammabilité (gaz)	66
A. 12. Inflammabilité (substances et préparations qui, en contact avec l'eau ou l'air humide, développent des gaz facilement inflammables en quantités dangereuses)...	68
A. 13. Inflammabilité (solides et liquides)	72
A. 14. Danger d'explosion	74
A. 15. Auto-inflammabilité (détermination de la température d'auto-inflammabilité des liquides volatils et des gaz)	84
A. 16. Auto-inflammabilité (solides — détermination de la température relative d'inflammation spontanée)	86
A. 17. Propriétés comburantes	89
PARTIE B: Méthodes de détermination de la toxicité	94
Introduction générale	94
B. 1. Toxicité aiguë — administration orale	96
B. 2. Toxicité aiguë — administration par inhalation	99
B. 3. Toxicité aiguë — administration cutanée	103
B. 4. Toxicité aiguë — irritation de la peau	106
B. 5. Toxicité aiguë — irritation des yeux	109
B. 6. Toxicité aiguë — sensibilisation de la peau	113
B. 7. Toxicité subaiguë — administration orale	118
B. 8. Toxicité subaiguë — administration par inhalation	122
B. 9. Toxicité subaiguë — administration cutanée	127
B. 10. Autres effets: mutagenèse — épreuve cytogénétique <i>in vitro</i> sur mammifère	131
B. 11. Autres effets: mutagenèse — épreuve cytogénétique <i>in vivo</i> sur moelle osseuse de mammifère, analyse chromosomique	134
B. 12. Autres effets: mutagenèse — épreuve du micronoyau	137
B. 13. Autres effets: mutagenèse — essais de mutation réverse sur <i>Escherichia coli</i>	140
B. 14. Autres effets: mutagenèse — essais de mutation réverse sur <i>Salmonella typhimurium</i>	143
PARTIE C: Méthodes de détermination de l'écotoxicité	146
C. 1. Toxicité aiguë pour les poissons	146
C. 2. Toxicité aiguë pour les daphnies	155
C. 3. Dégradation biotique: test de screening OCDE modifié	160
C. 4. Dégradation biotique: essai AFNOR NF T 90/302 modifié	170
C. 5. Dégradation biotique: essai Sturm modifié	179
C. 6. Dégradation biotique: essai en fiole fermée	188
C. 7. Dégradation biotique: essai MITI modifié	199
C. 8. Dégradation: demande biochimique en oxygène	212
C. 9. Dégradation: demande chimique en oxygène	214
C. 10. Dégradation abiotique: hydrolyse en fonction du pH	216

PARTIE A: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES**A.1. POINT DE FUSION/INTERVALLE DE FUSION****1. MÉTHODES**

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Les méthodes et les appareils décrits ci-après permettent de déterminer le point de fusion des produits chimiques, quel que soit leur degré de pureté.

La sélection de la méthode dépend de la nature de la substance à tester.

Par conséquent, le facteur limitatif sera directement lié au fait que la substance est facilement, difficilement ou non pulvérisable.

Pour certaines substances, il est préférable de déterminer le point de congélation ou de solidification. C'est pourquoi, les normes de ces déterminations figurent également dans la ligne directrice.

1.2. Définition et unités

Le point de fusion est défini comme étant la température à laquelle se produit la transition de la phase solide à la phase liquide, à la pression atmosphérique normale.

Idéalement, cette température correspond à celle du point de solidification ou de congélation.

Étant donné que la transition de phase de nombreuses substances s'étale sur une large gamme de température, celle-ci est souvent décrite comme l'intervalle de fusion.

Conversion des unités (K en °C)

$$t = T - 273,15$$

où t est exprimé en degrés Celsius et T en degrés Kelvin.

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent essentiellement servir à l'étalonnage de la méthode de temps à autre et à la comparaison des résultats lorsqu'une autre méthode est appliquée.

Certaines substances d'étalonnage sont énumérées dans les références (2).

1.4. Principe de la méthode d'essai

La température (ou intervalle de température) de la transition de la phase solide à la phase liquide est déterminée. En pratique, les températures de début et de fin de fusion sont déterminées au cours du chauffage, à pression atmosphérique, de la substance à tester. Trois types de méthodes sont décrites: la méthode du tube capillaire, la méthode du banc chauffant et la détermination du point de congélation.

1.4.1. *Méthode du tube capillaire*

1.4.1.1. Dispositif comportant un bain liquide

Une petite quantité de substance finement pulvérisée est introduite dans un tube capillaire et tassée avec soin. Ce tube est chauffé en même temps qu'un thermomètre et l'accroissement de température est ajusté à un peu moins d'1 K par minute au cours de l'opération. Les températures correspondant au début et à la fin de la fusion sont relevées.

1.4.1.2. Dispositif comportant un bloc métallique

Le protocole est le même que celui décrit au paragraphe 1.4.1.1, si ce n'est que le tube capillaire et le thermomètre sont placés dans un bloc de métal chauffé et observés à travers des ouvertures aménagées dans ce dernier.

1.4.1.3. Détection photo-électrique

L'échantillon contenu dans le tube capillaire est chauffé automatiquement dans un cylindre métallique. Par une ouverture aménagée dans celui-ci, un faisceau de lumière est envoyé à travers la substance à tester vers une cellule photo-électrique soigneusement étalonnée. Au moment de la fusion, les propriétés optiques de la plupart des substances sont modifiées en ce sens que l'opacité fait place à la transparence. De ce fait, l'intensité de la lumière qui atteint la cellule photo-électrique augmente et envoie un signal d'arrêt à l'indicateur digital enregistrant la température du thermomètre à résistance de platine placé dans l'enceinte chauffante. Cette méthode n'est pas applicable à certaines substances fortement colorées.

1.4.2. *Méthodes avec surface chauffée*

1.4.2.1. Méthode au banc chauffant de Kofler

Le banc chauffant de Kofler est composé de deux pièces de métal de conductivité thermique différente, qui sont chauffées électriquement. Il est construit de façon à ce que le gradient de température soit quasi linéaire sur toute sa longueur. La température de ce banc chauffant peut varier de 283 à 543 K grâce à un dispositif de lecture de la température comprenant un curseur avec un index et règle graduée, spécialement conçus pour le banc en question. Pour déterminer un point de fusion, il suffit de déposer une fine couche de substance directement sur la surface du banc. En quelques secondes, il se forme une fine ligne de division entre la phase fluide et la phase solide. La température à la hauteur de cette ligne est lue en plaçant l'index face à cette dernière.

1.4.2.2. Microscope à fusion

Différents microscopes à platine chauffante sont utilisés pour déterminer des points de fusion avec de très petites quantités de substance. La température est généralement mesurée à l'aide d'un thermocouple sensible, mais parfois aussi à l'aide d'un thermomètre à mercure. Le dispositif type comporte une enceinte chauffante qui contient une platine de métal sur laquelle est posée une lame de verre destinée à recevoir l'échantillon. Le centre de la platine métallique est percé d'un trou permettant le passage de la lumière provenant du miroir éclairant le microscope. Lors de l'utilisation, l'enceinte est fermée à l'aide d'une plaque de verre pour empêcher la circulation d'air dans le champ de travail. Le chauffage de l'échantillon est réglé au moyen d'un rhéostat.

Pour des mesures très précises, il est possible d'utiliser de la lumière polarisée lors de l'analyse des substances optiquement anisotropes.

1.4.2.3. Méthode du ménisque

Cette méthode s'applique spécialement aux polyamides.

Détermination de la température à laquelle on observe à l'œil nu le déplacement d'un ménisque d'huile de silicone, emprisonné entre une surface chaude et un couvre-objet placé au-dessus de l'échantillon de polyamide à tester.

1.4.3. *Méthode de détermination du point de congélation*

L'échantillon est introduit dans un tube à essais spécial et placé dans un appareil permettant la détermination du point de cristallisation.

L'échantillon est agité doucement durant tout le refroidissement tandis que la température est relevée et enregistrée toutes les trente secondes.

Dès que quelques relevés indiquent une température constante, la valeur de cette dernière est considérée comme le point de cristallisation (après correction thermométrique).

1.5. Critères de qualité

Les conditions d'application et la précision des différentes méthodes de détermination du point de fusion/intervalle de fusion sont indiquées dans le tableau suivant.

TABLEAU: APPLICABILITÉ DES MÉTHODES

A. Méthodes du tube capillaire

Méthode de mesure	Substances facilement pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision maximale approximative ⁽¹⁾	Observation
Dispositif comportant un bain de liquide	Oui	Seulement quelques unes	De 273 à 573 K	± 0,3 K	Norme existante: JIS K 0064
Dispositif comportant un bloc métallique	Oui	Seulement quelques unes	De 293 à 573 K	± 0,5 K	Norme existante: ISO 1218 (E)
Détection photo-électrique	Oui	Plusieurs avec des dispositifs d'application	De 253 à 573 K	± 0,1 K	

(¹) Valeur dépendant du type d'instrument et du degré de pureté des substances.

B. Méthodes de la surface chaude et du point de congélation

Méthode de mesure	Substances facilement pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision maximale approximative ⁽¹⁾	Observation
Plaque chaude de Kofler	Oui	Non	De 283 à 543 K	± 1,0 K	Norme existante: ANSI/ASTM D 3451-76
Microscope à fusion	Oui	Seulement quelques unes	De 273 à 573 K (jusque 1 773 K)	± 0,2 K	Norme existante: DIN 53736
Méthode du ménisque	Non	Spécifique aux polyamides	De 293 à 573 K	± 0,5 K	Norme existante: ISO 1218 (E)
Méthode du point de congélation	Pour les substances liquides	Pour les substances liquides	De 223 à 573 K	± 0,5 K	Norme existante: telle que BS 4699

(¹) Valeur dépendant du type d'instrument et du degré de pureté des substances.

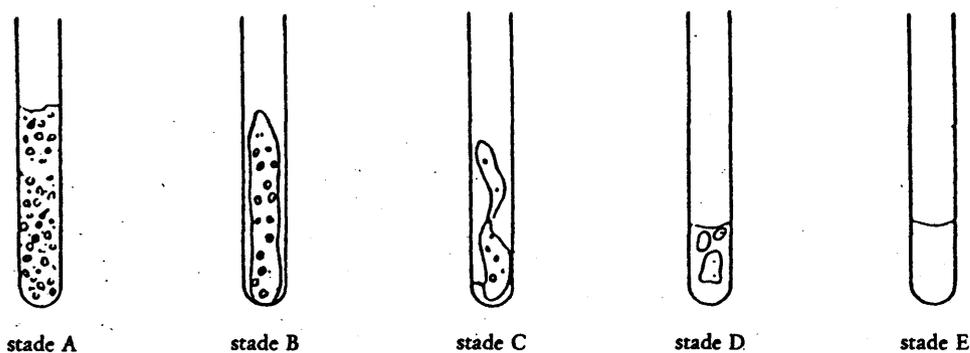
1.6. Description des méthodes

Les procédures de presque toutes les méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir appendice).

1.6.1. Méthode du tube capillaire

Lorsque l'élévation de température est lente, les substances finement pulvérisées passent habituellement par les stades de fusion représentés à la figure 1.

Figure 1



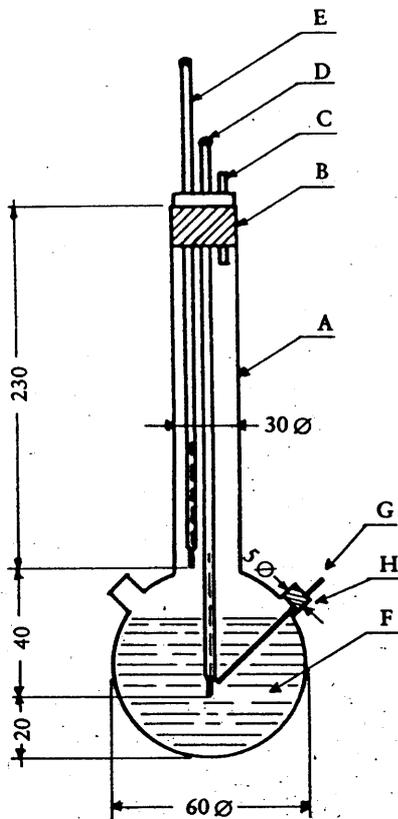
- Stade A (début de la fusion; point humide): de fines gouttes adhèrent uniformément à la paroi intérieure du tube capillaire.
- Stade B (point de retrait): un espace libre apparaît entre l'échantillon et la paroi intérieure, en raison de la rétraction du produit en fusion.
- Stade C (point d'affaissement): l'échantillon rétracté commence à s'affaisser et à se liquéfier.
- Stade D (point de liquéfaction): un ménisque complet se forme à la surface, mais il reste encore une certaine quantité de particules solides.
- Stade E (fin de la fusion): il n'y a plus aucune particule solide.

Durant la détermination du point de fusion, il y a lieu de relever la température au début et à la fin de la fusion.

1.6.1.1. Dispositifs comportant un bain de liquide

La figure 2 décrit un type d'appareil standardisé (JIS K 0064). Toutes les spécifications sont exprimées en millimètres, l'appareil est en verre.

Figure 2



- A: Ballon de mesure
- B: Bouchon en liège
- C: Tube d'aération
- D: Thermomètre
- E: Thermomètre auxiliaire
- F: Bain de liquide
- G: Tube capillaire en verre (80 à 100 mm de longueur; 1 mm \pm 0,2 mm de diamètre intérieur et 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de paroi)
- H: Tube latéral

Bain liquide

Le liquide à utiliser doit être choisi en fonction du point de fusion. La paraffine liquide sera utilisée pour les points de fusion ne dépassant pas 473 K; de l'acide sulfurique concentré ou de l'huile de silicone pour les points de fusion ne dépassant pas 573 K.

Un mélange composé de trois parties d'acide sulfurique et de deux parties de sulfate de potassium (en rapport pondéral) peut être utilisé pour les points de fusion supérieure à 523 K.

Thermomètre

Seuls peuvent être utilisés les thermomètres qui répondent aux exigences des normes suivantes ou de leurs équivalents: ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

Procédé

La substance sèche est finement pulvérisée dans un mortier et introduite dans un tube capillaire scellé à une extrémité, la hauteur de remplissage étant fixée à environ 3 millimètres après tassement. Pour obtenir un échantillon uniformément tassé, il faut laisser tomber le tube capillaire d'une hauteur d'environ 700 millimètres à l'intérieur d'un tube en verre posé verticalement sur un verre de montre.

Le tube capillaire ainsi rempli est placé dans le bain de telle sorte que la partie centrale du réservoir à mercure du thermomètre soit en contact avec la partie du capillaire contenant l'échantillon. En général, le tube capillaire n'est introduit dans l'appareil qu'au moment où le bain est à environ 10 K en dessous du point de fusion.

Le chauffage du bain est réglé de façon que l'accroissement de température atteigne 3 K par minute. Le liquide doit être agité. À environ 10 K sous la température attendue, l'accroissement de température est réglé à un maximum de 1 K par minute.

Calcul

Le calcul du point de fusion s'effectue au moyen de la formule suivante:

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

où

T = température de fusion corrigée, exprimée en K

T_D = température lue sur le thermomètre D, exprimée en K

T_E = température lue sur le thermomètre E, exprimée en K

n = nombre de graduations de la colonne de mercure sur la tige émergente du thermomètre D.

1.6.1.2. Bloc métallique

Appareil

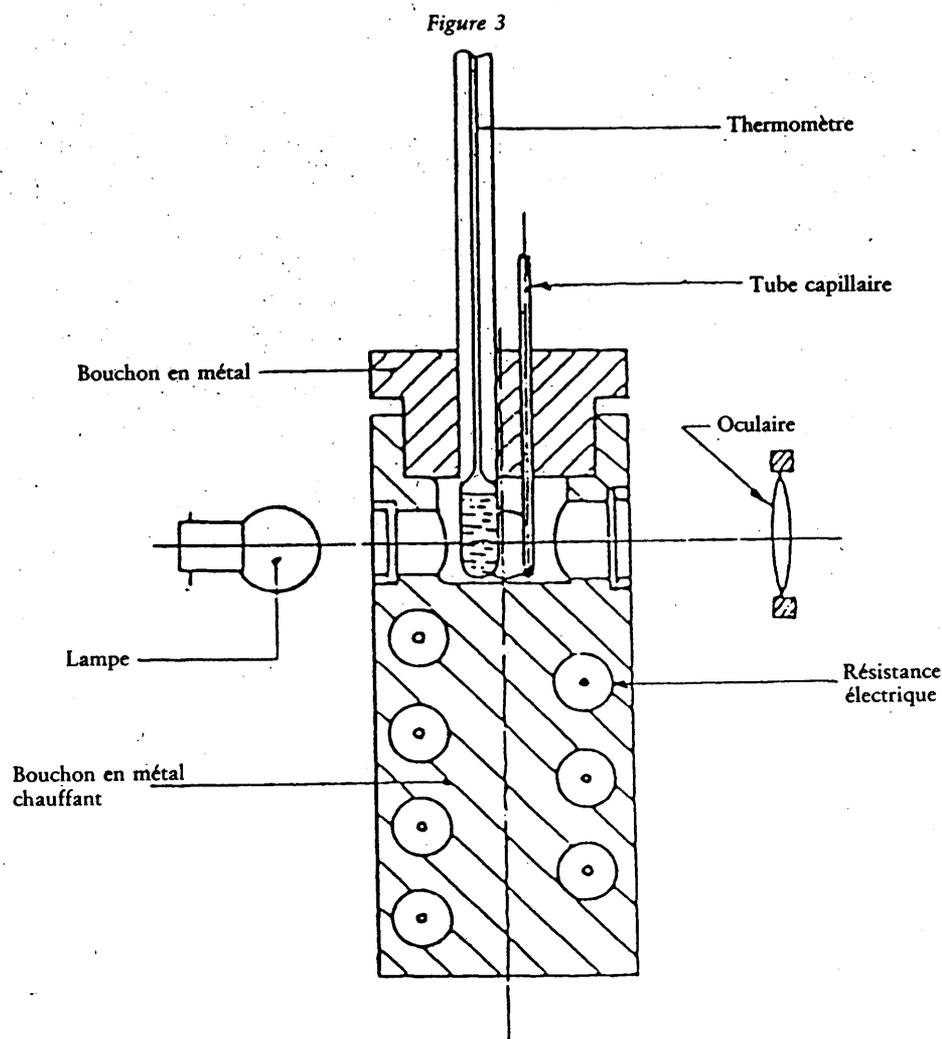
L'appareil comprend:

- un bloc métallique cylindrique dont la partie supérieure est creuse et forme une enceinte de chauffe (voir figure 3),
- un bouchon métallique percé de deux ou plusieurs trous permettant l'introduction des tubes dans le bloc,
- un système de chauffage du bloc métallique, qui peut être constitué d'une résistance électrique dans le bloc,
- un rhéostat pour régler la puissance dans le cas d'un chauffage électrique,
- les parois latérales de l'enceinte, percées de quatre fenêtres en verre résistant à la chaleur, diamétralement opposées. En face d'une de ces fenêtres est installé un oculaire pour observer le tube capillaire. Les trois autres fenêtres permettent d'éclairer l'intérieur de l'enceinte à l'aide de lampes,
- un tube capillaire, en verre résistant à la chaleur scellé à une extrémité (voir point 1.6.1.1).

Thermomètre:

Voir normes 1.6.1.1.

Des éléments thermo-électriques de précision équivalente sont aussi utilisables.



Procédé

Voir point 1.6.1.1. La correction du thermomètre n'est pas nécessaire dans le présent dispositif. La température de fusion enregistrée est considérée comme le point de fusion.

1.6.1.3. Détection photo-électrique**Appareil et procédé:**

L'appareil consiste en une enceinte métallique pourvue d'un système de chauffage automatisé. Trois tubes capillaires sont remplis comme prévu au point 1.6.1.1 et sont placés dans le four.

On dispose de cinq accroissements linéaires de température pour étalonner l'appareil. L'accroissement de température approprié est électriquement réglé à un taux constant et linéaire présélectionné. Des enregistreurs indiquent la température réelle du four et le point de fusion de la substance dans les tubes capillaires.

1.6.2. Méthodes de la surface chauffée**1.6.2.1. Banc chauffant de Kofler**

Voir appendice.

1.6.2.2. Microscope à fusion

Voir appendice.

1.6.2.3. Méthode du ménisque (polyamides)

Voir appendice.

Aux alentours du point de fusion, l'accroissement de la température doit être inférieur à 1 K par minute.

1.6.3. Méthodes de détermination du point de congélation

Voir appendice.

2. DONNÉES

La correction du thermomètre s'impose dans certains cas.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAIS

La méthode utilisée doit être indiquée.

Le point de fusion indiqué dans le rapport est la moyenné de deux mesures au moins qui ne dépassent pas les limites de la précision approximative (voir tableau). Une estimation de la précision doit être fournie. Si la différence entre la température au début et la température à la fin de la fusion se trouve dans les limites de précision de la méthode, la température relevée à la phase finale de la fusion est considérée comme le point de fusion, sinon les deux températures sont indiquées.

Certaines substances peuvent se décomposer ou se sublimer avant que le point de fusion ne soit atteint. Dans ce cas, il y a lieu de le signaler.

Toutes les informations et observations intéressantes pour l'interprétation des résultats doivent être fournies, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

4. RÉFÉRENCES

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

(2) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, vol. 48, 1976, p. 505-515.

Appendice

Pour plus de détails techniques, on peut consulter par exemple les normes suivantes :

1. Méthodes du tube capillaire

1.1. Dispositifs comportant un bain liquide

ASTM E 324-69 Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals

BS 4634 Method for the Determination of Melting Point and/or Melting range

DIN 53181 Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren

JIS K 00-64 Testing Methods for Melting Point of Chemical Products

1.2. Dispositif comportant un bloc métallique

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E) Plastics-Polyamides-Determination of «Melting Point»

2. Méthodes de la surface chaude

2.1. Plaque chaude de Kofler

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

2.2. Microscope à fusion

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Méthode du ménisque (polyamides)

ISO 1218 (E) Plastics-Polyamides-Determination of «Melting-Point»

ANST/ASTM D 2133-66 Standard Specification for acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials

NF T 51 050 Résines de polyamides. Détermination du «point de fusion». Méthode du ménisque

3. Méthodes de détermination du point de congélation

BS 4633 Method for the Determination of Crystallizing Point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)

DIN 10319 Bestimmung des Gefrierpunktes von Milch

DIN 51421	Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbezölen
DIN 51556	Bestimmung des Erstarrungspunktes am rotierenden Thermometer
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines

A. 2. POINT D'ÉBULLITION/INTERVALLE D'ÉBULLITION

1. MÉTHODES

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Les méthodes et dispositifs décrits ici peuvent être appliqués aux substances liquides qui ne subissent pas de réaction chimique en dessous du point d'ébullition (par exemple auto-oxydation, réarrangement, dégradation, etc.). Les méthodes s'appliquent aux substances liquides pures et impures.

L'importance donnée à la description de la méthode recourant à la détection photo-électrique est due au fait que cette dernière permet de déterminer non seulement le point d'ébullition, mais aussi le point de fusion. De surcroît, les mesures peuvent être effectuées de manière automatique.

La « méthode dynamique » a l'avantage de pouvoir être également utilisée pour la détermination de la pression de vapeur et il est inutile de ramener la température d'ébullition aux conditions normales de pression (101,325 kPa) puisque la pression normale peut être maintenue au cours de la mesure. Mais cette méthode n'est pas encore automatisée.

Observations

L'influence des impuretés sur la détermination du point d'ébullition dépend beaucoup de la nature de l'impureté. Cette influence peut être considérable si l'échantillon contient un solvant très volatil.

La composition de l'échantillon étudié varie à chaque mesure en raison de la volatilisation des composants à point d'ébullition faible. Dans ces conditions, on obtient des valeurs de plus en plus fortes.

1.2. Définitions et unités

La température d'ébullition normale est définie comme la température à laquelle la pression de vapeur saturante d'un liquide est égale à la pression normale.

La valeur mesurée du point d'ébullition dépend de la pression atmosphérique. Cette dépendance peut être calculée quantitativement par l'équation de Clapeyron-Clausius suivante:

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

où

p = pression de vapeur de la substance en Pascal

ΔH_v = chaleur de vaporisation en J mol⁻¹

R = constante molaire universelle des gaz = 8,31 J mol⁻¹ K⁻¹

T = température exprimée en K.

La température au point d'ébullition (température d'ébullition) est donnée pour la pression ambiante au moment de la mesure.

Conversions:

Pression (unité: kPa).

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa (l'utilisation du « bar » est encore permise, mais non recommandée).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr (l'utilisation du « Torr » et du « mm Hg » n'est pas permise).

Température (unité: K).

t = T - 273,15

(t en °C et T en K).

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'utiliser des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Ces substances de référence servent essentiellement à étalonner la méthode de temps à autre et à permettre de comparer les résultats.

Certaines substances d'étalonnage figurant dans les méthodes énumérées à l'appendice.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Toutes les méthodes de détermination du point d'ébullition (ou de l'intervalle d'ébullition) sont basées sur la mesure de la température d'ébullition. Cinq méthodes sont décrites ci-après :

1.4.1. *Méthode de l'ébulliomètre*

Bien que les ébulliomètres aient été à l'origine mis au point pour la détermination du poids moléculaire par élévation du point d'ébullition, ils se prêtent également aux mesures exactes du point d'ébullition. Un appareil très simple est décrit dans la norme ASTM D 1120-72 (voir appendice). Dans cet appareil, le liquide est chauffé jusqu'à ébullition à la pression atmosphérique (conditions d'équilibre).

1.4.2. *Méthode dynamique*

Cette méthode comporte la mesure de la température de recondensation de la vapeur à l'aide d'un thermocouple placé dans le reflux pendant l'ébullition. La pression peut être modifiée dans cette méthode.

1.4.3. *Méthode par distillation pour point et intervalle d'ébullition*

Cette méthode comporte la distillation du liquide, la mesure de la température de recondensation de la vapeur et la détermination de la quantité de distillat.

1.4.4. *Méthode selon Siwoloboff*

Un échantillon est chauffé dans un tube à essais, qui est immergé dans un bain de liquide chauffé. Un capillaire scellé, contenant une bulle d'air dans sa partie inférieure, est plongé dans le tube à essais.

La température à laquelle un chapelet continu de bulles s'échappe du capillaire ou la température à laquelle le chapelet de bulles s'interrompt lors d'un refroidissement momentané et le fluide commence soudainement à monter dans le capillaire est déterminée (Siwoloboff).

1.4.5. *Détection photo-électrique*

Suivant le principe de Siwoloboff, l'ascension des bulles permet une mesure photo-électrique automatique.

1.5. Critères de qualité

L'applicabilité et la précision des différentes méthodes utilisées pour la détermination du point d'ébullition/intervalle d'ébullition sont indiquées au tableau 1.

1.6. Description des méthodes

Les procédures de certaines méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir appendice).

1.6.1. *Ébulliomètre*

Voir appendice.

1.6.2. *Méthode dynamique*

Voir méthode d'essai A. 4 pour la détermination de la pression de vapeur.

La température d'ébullition à 101,325 kPa est enregistrée.

1.6.3. *Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)*

Voir appendice.

TABLEAU 1: COMPARAISON DES MÉTHODES

Méthode de mesure	Précision approximative	Remarques
Ébulliomètre	± 1,4 K (jusqu'à 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ± 2,5 K (au-dessus de 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	Norme existante: ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Méthode dynamique	± 0,5 K ⁽²⁾	
Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)	± 0,5 K	Normes existantes: par exemple ISO/R 918 DIN 53171 BS 4591/71
Méthode selon Siwoloboff	± 1 K à ± 2 K ⁽²⁾	
Détection photo-électrique	± 0,3 K (à 373 K) ⁽²⁾	

⁽¹⁾ Cette précision n'est valable que pour des appareils simples comme celui décrit dans la norme ASTM D 1120-72; il est possible de l'améliorer en utilisant des ébulliomètres plus perfectionnés.

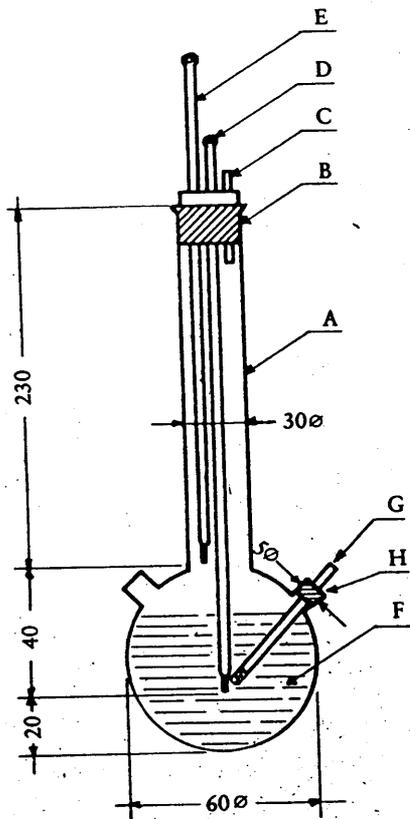
⁽²⁾ Valable seulement pour des substances pures.

1.6.4. *Méthode selon Siwoloboff*

L'échantillon est introduit dans un tube à essais ayant environ 5 millimètres de diamètre et chauffé dans un appareil servant à la détermination du point de fusion (voir figure 1).

La figure 1 donne un exemple d'appareil normalisé servant à déterminer le point de fusion et le point d'ébullition (JIS K 0064). Les spécifications sont données en millimètres, l'appareil est en verre.

Figure 1



- A: Ballon de mesure
- B: Bouchon
- C: Tube d'aération
- D: Thermomètre
- E: Thermomètre auxiliaire
- F: Bain de liquide
- G: Tube à essais (maximum 5 mm de diamètre extérieur)
Tube capillaire (environ 100 mm de longueur, 1 mm de diamètre intérieur, 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de paroi)
- H: Tube latéral

Un tube capillaire (capillaire d'ébullition) scellé à environ 1 centimètre au-dessus de son extrémité inférieure est plongé dans le tube à essais contenant la substance à tester. La partie scellée du capillaire doit se trouver en dessous de la surface du liquide. Le tube à essais doit être attaché au thermomètre (voir figure 2).

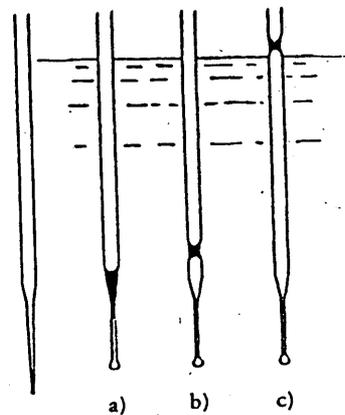
Figure 2

Méthode selon Siwoloboff



Figure 3

Méthode modifiée



Le liquide du bain est choisi en fonction de la température d'ébullition. On peut utiliser l'acide sulfurique ou l'huile de silicone pour des températures allant jusqu'à 573 K. La paraffine liquide ne convient que pour des températures inférieures à 473 K. Au départ, le chauffage du bain doit être réglé de façon à obtenir un accroissement de température de 3 K par minute. Il y a lieu d'agiter le liquide du bain. À environ 10 K en dessous du point d'ébullition présumé, le chauffage est réduit de telle sorte que l'accroissement de température ne dépasse pas 1 K par minute. À l'approche de la température d'ébullition, des bulles commencent à sortir du capillaire.

Le point d'ébullition est défini par la température à laquelle, lors d'un refroidissement momentané, le chapelet de bulles s'interrompt et le liquide s'élève dans le capillaire. La température relevée sur le thermomètre à ce moment précis correspond à la température d'ébullition de la substance à tester.

Dans la méthode modifiée (voir figure 3), le point d'ébullition est déterminé dans un capillaire à point de fusion. L'extrémité inférieure de ce dernier est étirée en une fine pointe d'environ 2 centimètres de longueur (a) et une petite quantité de la substance à tester est aspirée à l'intérieur. La pointe est alors scellée en emprisonnant une petite bulle d'air. Lors du chauffage dans l'appareil de point de fusion (b), la bulle d'air se dilate. Le point d'ébullition correspond à la température à laquelle l'échantillon de la substance atteint le niveau de la surface du bain de liquide (c).

1.6.5.

Détection photo-électrique

Un échantillon de la substance à tester est chauffé dans un tube capillaire placé à l'intérieur d'un bloc métallique chauffant.

Par les ouvertures aménagées dans le bloc, un faisceau de lumière est envoyé à travers la substance vers une cellule photo-électrique étalonnée de façon précise.

Durant l'accroissement de la température de l'échantillon, quelques bulles d'air s'échappent du capillaire d'ébullition. Lorsque la température d'ébullition est atteinte, le nombre de bulles augmente très fortement. La modification de l'intensité lumineuse qui s'ensuit est enregistrée par la cellule, qui envoie un signal d'arrêt à l'indicateur de température (thermomètre à résistance de platine placé dans le bloc).

Cette méthode est particulièrement utile parce qu'elle permet d'effectuer des déterminations en dessous de la température ambiante jusqu'à 253,15 K (-20 °C) et ce, sans aucune modification de l'appareil. Il doit seulement être placé dans une chambre froide ou dans un bain réfrigérant. Les fiches techniques fournies avec l'appareil donnent tous les détails nécessaires à la bonne exécution de la détermination du point d'ébullition.

2.

DONNÉES

Pour de faibles écarts avec la pression normale (maximum ± 5 kPa), les températures du point d'ébullition peuvent être corrigées (T_n) par l'équation de Sidney-Young:

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

où

Δp = (101,325 - p) attention au signe

p = pression barométrique en kPa

f_T = vitesse de variation du point d'ébullition avec la pression, en K/kPa

T = valeur mesurée de la température d'ébullition, en K

T_n = valeur corrigée de la température d'ébullition, en K à la pression normale.

Les facteurs de correction de la température (f_T) et les équations pour leur approximation, figurent dans les normes internationales et nationales citées dans le texte (valable pour de nombreuses substances).

Par exemple, la méthode DIN 53171 donne les corrections pour les solvants contenus dans les peintures:

TABLEAU 2: FACTEURS DE CORRECTION DE LA TEMPÉRATURE (f_T)

Température T en K	Facteur de correction f_T en K/kPa
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

La méthode utilisée doit être indiquée. Le point d'ébullition déterminé est la moyenne d'au moins deux mesures qui se situent à l'intérieur des limites de précision approximative indiquées au tableau 1. Si les déterminations ne sont pas reproductibles, il y a lieu d'envisager d'autres méthodes.

Les valeurs mesurées des points d'ébullition ainsi que leurs moyennes doivent être indiquées et la (ou les) pression(s) auxquelles ont été effectuées les mesures doivent être enregistrées en kPa.

La pression doit de préférence être proche de la pression normale. Lorsque l'ébullition d'une substance à tester s'étale sur une large gamme de températures, cet intervalle d'ébullition doit figurer dans le rapport. Des estimations en matière de précision seront fournies pour tous les résultats.

Toutes les informations et observations intéressantes pour l'interprétation des résultats doivent être fournies, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

4. RÉFÉRENCES

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

Appendice

Pour plus de détails techniques, on peut consulter les normes suivantes:

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

2. **Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)**
ISO/R 918 Test method for distillation (distillation yield and distillation range)
BS 4349/68 Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/71 Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171 Lösungsmittel für Anstrichstoffe. Bestimmung des Siedeverlaufes

A. 3. DENSITÉ RELATIVE

1. MÉTHODE

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Les méthodes de détermination de la densité relative décrites s'appliquent aux substances solides et liquides, quel que soit leur degré de pureté. Les diverses méthodes à appliquer sont énumérées au tableau.

1.2. Définitions et unités

La densité relative (D_4^{20}) des solides ou liquides est le rapport entre la masse d'un volume de substance à étudier, déterminée à 20 °C, et la masse du même volume d'eau, déterminée à 4 °C. La densité relative est un nombre sans dimension.

La densité (ρ) d'une substance est le quotient de sa masse m par son volume v .

En unités SI, la densité est donnée en kilogrammes par mètre cube.

1.3. Substances de référence (1) (2)

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance.

On doit s'en servir essentiellement pour étalonner la méthode de temps à autre et pour permettre de comparer les résultats.

1.4. Principe des méthodes

Quatre méthodes sont appliquées.

1.4.1. Méthode de flottabilité

1.4.1.1. Aréomètre (pour les liquides)

On peut obtenir des déterminations de densité suffisamment précises et rapides à l'aide d'aréomètre flottants qui permettent de déduire la densité d'un liquide, de la profondeur d'immersion repérée sur une échelle graduée.

1.4.1.2. Balance hydrostatique (pour substances liquides et substances solides)

La différence entre le poids d'un échantillon d'essai mesuré dans l'air et dans l'eau peut servir à déterminer sa densité.

Dans le cas des solides, la densité mesurée n'est représentative que de l'échantillon d'essai utilisé. Pour déterminer la densité d'un liquide, on pèse un corps d'un volume V connu, tout d'abord dans l'air, puis dans le liquide.

1.4.1.3. Méthode de la sphère immergée (pour les substances liquides) (3)

Dans cette méthode, la densité d'un liquide est déterminée à partir de la différence entre les résultats de la pesée du liquide avant et après immersion d'une sphère de volume connu dans ce liquide.

1.4.2. Méthodes pycnométriques

Pour les solides ou les liquides, on peut utiliser des pycnomètres de formes variées dont les volumes sont connus. La densité est calculée à partir de la différence de poids entre le pycnomètre plein et le pycnomètre vide, d'une part, et de son volume connu, d'autre part.

1.4.3. Pycnomètre de comparaison à air (pour les solides).

La densité d'un solide de forme quelconque peut être mesurée, à la température ambiante à l'aide d'un pycnomètre de comparaison à gaz. Le volume d'une substance dans l'air ou un gaz inerte est mesuré dans une éprouvette jaugée de volume variable. Pour le calcul de la densité, une mesure de masse est effectuée après la mesure de volume.

1.4.4. Densimètre oscillant (4) (5) (6).

La densité d'un liquide peut être mesurée à l'aide d'un densimètre oscillant, c'est-à-dire d'un oscillateur ayant la forme d'un tube en U qui oscille à une fréquence spécifique dépendant de sa masse.

L'introduction d'un échantillon modifie la fréquence de résonance de l'oscillateur. Ce dernier doit être étalonné à l'aide de deux substances de densités connues.

Les substances doivent être choisies de façon à ce que leurs densités couvrent l'intervalle de mesure.

1.5. Critères de qualité

L'application des différentes méthodes utilisées pour la détermination de la densité relative est représentée au tableau.

La précision citée dans la norme ISO se rapporte uniquement à des substances pures.

1.6. Description des méthodes

Les références des normes citées en exemple, qui peuvent être consultées pour obtenir des détails techniques supplémentaires, sont jointes à l'appendice.

Les essais doivent être effectués à une température de 20 °C, et comporter au moins deux mesures.

2. DONNÉES

Voir normes.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

La méthode ou la norme utilisée fera l'objet d'un rapport.

La densité relative (D_4^{20}) doit être indiquée selon la définition figurant au point 1.2 en même temps que l'état physique de la substance examinée. Toutes les informations et observations intéressantes pour l'interprétation des résultats doivent être données, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

TABLEAU 1: APPLICABILITÉ DES MÉTHODES

Méthodes de mesure	Densité		Viscosité dynamique maximale possible	Observations
	solide	liquide		
1.4.1.1. Aréomètre		×	5 Pa s	ISO 387 ISO/R 649
1.4.1.2. Balance hydrostatique a) solides b) liquides	×	×	5 Pa s	ISO/R 1185 (A) ISO/R 91 et R 758
1.4.1.3. Méthode de la sphère immergée		×	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pycnomètre a) solides b) liquides	×	×	500 Pa s	ISO/R 3507 ISO/R 1183 (B) ISO/R 758
1.4.3. Pycnomètre de comparaison à air	×			DIN 55990 partie 3 DIN 53243
1.4.4. Densimètre oscillant		×	5 Pa s	

4.

RÉFÉRENCES

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

Appendice

Pour plus de détails techniques, on peut consulter les normes suivantes:

1. Méthodes de flottabilité

1.1. *Aréomètre*

- DIN 12790 Hydrometer: general instructions
ISO 387
DIN 12791 Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use
Part II: Density hydrometers - standardised sizes, designation
ISO/R 649
DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. *Balance hydrostatique*

Pour les substances solides:

- ISO R 1183 Method A. Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
ASTM-D-792 Specific Gravity and Density of Plastics by Displacement
DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pour les substances liquides

- ISO R 91 ISO R 758
DIN 51757 Testing of mineral oils and related materials; determination of density.
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 et ASTM D 1481-62
ASTM D 1298 Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method
BS 4714 Density, Specific gravity or API gravity of crude Petroleum and liquid Petroleum Products by Hydrometer Method

1.3. *Méthodes de la sphère immergée*

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

2. Méthodes pycnométriques

2.1. *Pour les substances liquides*

- ISO 3507 Pycnometers
ISO/R 758 Liquid chemical products: determination of density at 20 °C
DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)
DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ at 15 °C)

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

2.2.

Pour les substances solides

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

3.

Pycnomètre de comparaison à air

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

A. 4. PRESSION DE VAPEUR

1. MÉTHODE

Les méthodes décrites sont basées sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Il est souhaitable de disposer d'informations préliminaires concernant la structure, le point de fusion et le point d'ébullition de la substance avant de procéder à cet essai.

Il n'existe aucune méthode de mesure qui soit applicable à toute la gamme de pressions de vapeur. C'est pourquoi plusieurs méthodes sont recommandées pour la mesure des pressions de vapeur allant de $< 10^{-3}$ Pa à 10^5 Pa.

D'une manière générale, les impuretés ont une incidence sur la pression de vapeur. L'influence des impuretés sur la détermination de la pression de vapeur dépend en grande partie de la nature de l'impureté. L'effet peut être considérable si un solvant hautement volatil se trouve présent dans l'échantillon.

1.2. Définitions et unités

La pression de vapeur d'une substance est la pression de saturation au-dessus d'une substance solide ou liquide. À l'équilibre thermodynamique, la pression de vapeur d'une substance pure est uniquement fonction de la température.

L'unité SI de pression à utiliser est le pascal (Newton/m²).

Ci-après les unités couramment employées autrefois et leurs facteurs de conversion :

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

1 atmosphère (physique, atm) = $1,013 \times 10^5$ Pa

1 atmosphère (technique, at) = $9,81 \times 10^4$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

L'unité SI thermique est le degré Kelvin (K).

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'employer, dans tous les cas, des substances de référence lors de l'étude d'une nouvelle substance. Ces substances devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et permettre de comparer les résultats obtenus avec ceux d'une autre méthode.

1.4. Principe des méthodes

Le présent paragraphe propose cinq méthodes de détermination de la pression de vapeur qui sont applicables à différentes gammes de pressions de vapeur. Dans le cadre de chaque méthode, la pression de vapeur est déterminée à différentes températures. Dans une gamme de températures limitées, le logarithme de la pression de vapeur d'une substance pure est une fonction linéaire de l'inverse de la température.

1.4.1. Méthode dynamique

La méthode dynamique est basée sur la mesure de la température d'ébullition qui correspond à une pression spécifiée.

Gamme recommandée :

de 10^3 Pa jusqu'à 10^5 Pa, entre 20 °C et 100 °C.

La présente méthode a aussi été recommandée pour la détermination des points d'ébullition ne dépassant pas 350 °C.

1.4.2. Méthode statique

Dans le présent procédé, la pression de vapeur s'établissant dans un système fermé à l'équilibre thermodynamique est déterminée à une température spécifiée.

Cette méthode est applicable aux solides et aux liquides qui contiennent un ou plusieurs composants.

Gamme recommandée:

de 10 Pa jusqu'à 10^5 Pa, entre 0 °C et 100 °C.

1.4.3. Isoténiscope

Il s'agit d'une méthode normalisée, qui est aussi un procédé statique. Toutefois, elle n'est pas applicable aux systèmes à plusieurs composants. Le lecteur trouvera des informations supplémentaires dans la norme ASTM D-2879-75.

Gamme recommandée:

de 100 Pa jusqu'à 10^5 Pa, entre 0 °C et 100 °C.

1.4.4. Balance de pression de vapeur

La quantité de substance vaporisée par unité de temps dans un appareil de volume connu est déterminée sous pression réduite telle que le retour de la substance dans la cellule-réservoir soit négligeable (par exemple, par mesure de l'impulsion imprimée à une balance sensible par un jet de vapeur ou encore par mesure de la perte de poids de cellule-réservoir).

Gamme recommandée:

de 10^{-3} Pa jusqu'à 1 Pa, entre 0 °C et 100 °C.

1.4.5. Méthode de saturation des gaz

Un courant de gaz porteur inerte est envoyé à travers la substance, de telle sorte qu'il en ressorte chargé de vapeur saturante. Cette vapeur est ensuite recueillie dans un collecteur disposé à cet effet. La mesure de la quantité de substance transportée par un volume connu de gaz porteur permet de calculer la pression de vapeur à une température donnée.

Gamme recommandée:

jusqu'à 1 Pa.

1.5. Critères de qualité

Le tableau suivant présente une comparaison de différentes méthodes de détermination de la pression de vapeur, pour ce qui est du domaine d'application de la répétabilité, de la reproductibilité, de la gamme de mesure et des possibilités de normalisation.

TABLEAU: CRITÈRE DE QUALITÉ

Méthode de mesure	Substance		Estimation de la répétabilité ⁽¹⁾	Estimation de la reproduction ⁽¹⁾	Gamme recommandée	Possibilité de normalisation
	solide	liquide				
1.4.1. Méthode dynamique		×	jusqu'à 25 % 1— 5 %	jusqu'à 25 % 1— 5 %	De 10 ³ Pa à 2 · 10 ³ Pa De 2 · 10 ³ Pa à 10 ⁵ Pa	— —
1.4.2. Méthode statique	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10 Pa à 10 ⁵ Pa	—
1.4.3. Isothéniscope	×	×	5—10 %	5—10 %	De 10 ² Pa à 10 ⁵ Pa	ASTM-D 2879-75
1.4.4. Balance de pression de vapeur	×	×	5—20 %	jusqu'à 50 %	De 10 ⁻³ Pa à 1 Pa	—
1.4.5. Méthode de saturation des gaz	×	×	10—30 %	jusqu'à 50 %	De < 10 ⁻³ Pa jusqu'à 1 Pa	—

⁽¹⁾ Dépendant du degré de pureté.

1.6. Description des méthodes

1.6.1. Mesure dynamique

1.6.1.1. Appareil

L'appareil de mesure comporte un appareil à reflux avec réfrigérant en verre ou en métal (voir figure 1), un dispositif de régulation et de mesure de la température et un dispositif de régulation et de mesure de la pression. L'appareil de mesure représenté sur le schéma est en verre et se compose de cinq parties principales

Un tube partiellement à double paroi, comportant un joint rodé, un réfrigérant, un récipient de refroidissement et un orifice d'admission.

Un cylindre en verre relié à une pompe Cottrell, qui est monté sur la section du tube où s'effectue l'ébullition et qui possède une surface rugueuse pour éviter les soubresauts lors de l'ébullition.

Un thermocouple ou un thermomètre à résistance plongeant dans une petite quantité d'huile, qui est inséré dans un tube de chargement équipé d'un joint rodé mâle à son extrémité supérieure et scellé à son extrémité inférieure et qui permet de mesurer la température.

Une tubulure permettant de connecter le dispositif de régulation et de mesure de la pression.

Un volume-tampon qui est connecté à l'appareil de mesure par l'intermédiaire d'un tube capillaire.

Une cartouche chauffante est insérée de l'extérieur dans le bas de l'appareil en verre pour chauffer la colonne d'ébullition. Le courant nécessaire est obtenu au moyen d'un transformateur-régulateur et contrôlé à l'aide d'un ampèremètre.

Une pompe à huile permet d'obtenir le vide désiré (entre 10² et 10⁵ Pa environ).

Une bouteille d'azote est utilisée pour établir la pression souhaitée. Elle est connectée à l'appareil par l'intermédiaire d'une soupape qui sert aussi à ventiler l'appareil.

Une jauge de pression de précision connectée à la tubulure permet d'effectuer les mesures.

1.6.1.2. Procédé de mesure

On mesure la pression de vapeur en déterminant le point d'ébullition de l'échantillon à diverses pressions allant de 10^3 Pa à 10^5 Pa environ. Le point d'ébullition (ou l'équilibre dans le cas d'un mélange) est atteint lorsque la température reste constante (pour une pression donnée). Ce procédé de mesure n'est pas applicable aux substances moussantes.

Avant la mesure, tous les éléments en verre de l'appareil doivent être soigneusement nettoyés et séchés sous vide. La substance est alors introduite dans l'appareil. Quand les solides ne sont pas sous forme de poudre, le remplissage peut poser des problèmes. Toutefois, il est possible d'y remédier en chauffant l'eau de l'enveloppe de refroidissement. Après remplissage, l'appareil est assemblé et la substance est dégazée. La plus basse des pressions désirées est établie, le système de chauffage est mis en marche et le thermocouple ou le thermomètre à résistance est connecté à un enregistreur. Lorsque ce dernier indique une température d'ébullition fixe à pression constante, l'équilibre est atteint. Après enregistrement de cet équilibre, une pression plus élevée est établie. Le processus se poursuit de la même manière jusqu'à ce qu'une pression de 10^5 Pa soit atteinte (environ 5 à 10 mesures en tout, qui seront répétées pour vérification à des pressions décroissantes).

1.6.2. Mesure statique

1.6.2.1. Appareil

L'appareil de mesure (voir figure 2) comporte non seulement un système de chauffage et un système de refroidissement de verre et de métal pour porter l'échantillon à la température voulue, mais encore un dispositif permettant de régler et de mesurer la pression et la température.

La cellule contenant l'échantillon est reliée, d'une part, à un robinet à vide poussé en acier inoxydable et, d'autre part, à un tube en U rempli d'un liquide manométrique approprié. L'autre extrémité du tube en U se termine par une tubulure dont les trois branches mènent respectivement à la pompe à vide, à la bonbonne d'azote et à la jauge de pression.

Pour amener l'échantillon à la température choisie, la cellule-réservoir ainsi que le corps du robinet et une section suffisamment importante du tube en U (pratiquement parlant, jusqu'à la hauteur du corps du robinet) sont plongés dans un bain à température constante. La température est mesurée et enregistrée au moyen d'un thermocouple ou d'un thermomètre à résistance placé très près de l'extérieur de la cellule.

Lorsque l'échantillon doit être très fortement refroidi, on utilisera de l'azote liquide ou un mélange de neige carbonique et d'alcool. Dans ce cas, les mesures sont effectuées à l'aide d'un ultracryostat.

Une pompe adaptée et appropriée permet d'atteindre dans l'appareil la pression désirée.

En général, la pression de vapeur d'une substance est mesurée indirectement à l'aide d'un indicateur de zéro. Cet indicateur peut être un tube en U contenant un liquide, comme décrit ci-après, ou, par exemple, un manomètre à diaphragme. Dans un bain à température contrôlée, la pression de vapeur rompt l'équilibre du liquide contenu dans le tube en U. On rétablit l'équilibre de la pression par l'introduction d'azote dans l'appareil. La jauge de précision, qui se trouve à la température ambiante, permet de mesurer la pression d'azote utilisée, laquelle correspond à la pression de vapeur de la substance à la température constante correspondante. Différents liquides (mercure, huiles de silicones ou phtalates), selon la gamme de pressions et le comportement chimique de la substance, peuvent être utilisés dans le tube en U pour le réglage de zéro.

Le mercure peut être utilisé pour la pression atmosphérique jusqu'à 10^2 Pa, les huiles de silicone et les phtalates de 10^2 Pa à 10 Pa; quant au manomètre à membrane, il peut même être utilisé pour des pressions inférieures à 10^{-1} Pa.

1.6.2.2. Méthode de mesure

Avant la mesure, toutes les parties de l'appareil schématisé à la figure 2 sont soigneusement nettoyées à l'aide de solvants et séchées sous vide.

Le tube en U est rempli avec le liquide désiré, qui doit être préalablement dégazé à température élevée.

Après introduction de la substance à tester, l'appareil est assemblé et la cellule est suffisamment refroidie. Le robinet la surmontant est alors ouvert et le vide est fait dans l'appareil. Après quelques minutes, le robinet est refermé et l'échantillon est amené à la température voulue et le déplacement des colonnes du liquide du tube en U est compensé par l'introduction d'azote. La cellule est alors à nouveau refroidie. Toute pression résiduelle observée à l'issue de ce refroidissement est due soit à la présence d'une certaine quantité d'air libérée par l'échantillon au cours du chauffage (cette dernière peut être éliminée par une nouvelle mise sous vide de la cellule), soit à un refroidissement insuffisant. Il faut alors employer de l'azote liquide comme réfrigérant.

Lorsque l'échantillon est suffisamment dégazé, la dépendance de la pression de vapeur vis-à-vis de la température est déterminée à des intervalles de température assez rapprochés.

1.6.3. *Isoténiscope*

Pour une description complète de cette méthode (2) et pour le principe de l'appareil de mesure, voir figure 3. À l'instar de la méthode statique décrite au point 1.6.2, l'isoténiscope est applicable aux solides et aux liquides.

Dans le cas des liquides, la substance elle-même sert de liquide de remplissage dans le manomètre auxiliaire. Dans le cas des solides, on choisira l'un des manomètres liquides cités au point 1.6.2 en tenant compte des gammes de pression et de température requises. La sphère de l'isoténiscope pour liquides est remplie avec la substance qui est dégazée à température élevée au cours de l'ébullition.

La fraction de substance qui distille au cours de ce dégazage est condensée dans la sphère supérieure refroidie, d'où elle retombe dans le tube en U. Lorsque ce dernier contient une quantité suffisante de substance dégazée, il est plongé avec la sphère inférieure dans un bac thermostaté. Lorsque la température désirée est atteinte, la pression de vapeur est mesurée de manière indirecte dans la méthode décrite au point 1.6.2.

Dans le cas des solides, l'ampoule du côté de l'extrémité la plus longue de l'isoténiscope est remplie avec le liquide dégazé du manomètre. Le solide à examiner est ensuite introduit dans la sphère inférieure et dégazé à température élevée. L'isoténiscope est alors incliné de telle sorte que le liquide manométrique puisse couler dans le tube en U. La mesure de la pression de vapeur en fonction de la température est faite conformément à la description présentée au point 1.6.2.

1.6.4. *Balance de pression de vapeur*

1.6.4.1. *Appareil*

La littérature décrit plusieurs modèles d'appareils (1). L'appareil représenté à la figure 4 illustre bien les principes de la présente méthode. Il se compose d'un plateau de base surmonté d'une cloche de protection, d'une pompe avec dispositif de mesure du vide et d'un équipement de détermination de la pression de vapeur avec affichage de la déviation de l'aiguille. L'équipement incorporé suivant est monté sur le plateau de base:

- un four d'évaporation avec bride et canal d'alimentation rotatif. Il s'agit d'un récipient plat et cylindrique en cuivre (ou parfois en verre ceinturé de cuivre), qui est placé dans un étrier en cuivre vissé sur une pièce d'acier inoxydable à la hauteur de son bord saillant inférieur. La pièce d'acier est elle-même montée sur le plateau de base à l'aide d'une bride de manière à pouvoir tourner autour de l'axe du four. Le chauffage est produit par une résistance chauffante encastrée dans la pièce en acier inoxydable et, donc, isolée de la chambre à vide,
- le couvercle du four est en cuivre et possède trois orifices d'évaporation de sections différentes, situés à 90 degrés l'un de l'autre. Par rotation du fourneau, l'orifice choisi ou une position intermédiaire peut être amené sous la fente du refroidisseur placé excentriquement par rapport au four, ce qui permet soit d'axer le faisceau moléculaire sur le plateau de la balance, soit de l'en dévier. Un thermocouple ou un thermomètre à résistance est monté sur la paroi du four pour mesurer la température,
- la balance est un instrument à bobine mobile. L'aiguille est remplacée par un petit tube sur lequel sont montés le fléau et le contrepoids. Le fléau possède un plateau remplaçable constitué d'une fine plaque d'aluminium revêtu d'or. Un fil en constantan d'une épaisseur de 0,1 millimètre, sur lequel il est possible de placer des poids étalons, est attaché plus ou moins au centre du fléau. La pression de vapeur peut être enregistrée par une méthode photo-électrique d'enregistrement du point zéro,

- un cylindre en laiton entoure le plateau de la balance de tous côtés à l'exception des deux fentes permettant le mouvement du fléau et d'une ouverture étroite pour l'entrée du faisceau moléculaire. La dissipation de chaleur vers l'extérieur est assurée par une barre en cuivre, qui part du sommet du cylindre et traverse le plateau de base via un tube d'acier inoxydable thermiquement isolé. Sous le plateau de base, la barre plonge dans un vase Dewar contenant de l'azote liquide.

1.6.4.2. Méthode de mesure

Le four en cuivre est rempli avec la substance; le couvercle est fermé; l'orifice du plateau, le bouclier et le réfrigérant sont disposés au-dessus du four. La cloche est mise en place et les pompes à vide sont branchées. La pression à obtenir avant le commencement de la mesure est d'environ 10^{-4} Pa; à partir de 10^{-2} Pa, le refroidissement de l'enceinte de réfrigération commence.

Après un certain laps de temps, la balance atteint une température suffisamment basse pour que le jet de vapeur sortant se condense sur le plateau de la balance. Cette condensation produit un signal sur l'enregistreur relié à la balance. Ce signal peut être utilisé de deux manières différentes: en ce qui concerne l'appareil décrit ici, la pression de vapeur est déterminée directement à partir de la pression exercée sur le plateau de la balance (la masse moléculaire n'est pas requise). Dans le même temps, la masse condensée est déterminée et, partant, la vitesse d'évaporation peut être calculée à partir du temps de déposition. Ceci vaut pour les appareils plus généraux. La pression de vapeur est alors calculée à partir de la vitesse d'évaporation et de la masse moléculaire, au moyen de la relation de Hertz:

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

où

G = vitesse d'évaporation ($\text{kg/s} \cdot \text{m}^2$)

M = masse moléculaire (g/mol)

T = température (K)

R = constante molaire des gaz parfaits ($\text{J/mol} \cdot \text{K}$)

p = pression de vapeur (Pa).

Lorsque le vide nécessaire est atteint, une série de mesures est entreprise à la plus basse des températures choisies. L'orifice nécessaire est ouvert, le jet de vapeur traverse le bouclier directement monté sur le couvercle et vient frapper le plateau refroidi de la balance. Ce dernier est dimensionné de telle sorte que le jet tout entier soit collecté. Sous l'impulsion du jet de vapeur, une force s'exerce sur le plateau où les molécules se condensent au contact de sa surface froide. Cette force fait dévier le fléau de la balance de sa position d'équilibre. À l'extrémité du fléau, il y a une lamelle qui est surveillée optiquement à l'aide d'un système de prisme et de deux photodiodes.

Un circuit de contrôle replace alors momentanément le fléau dans sa position d'équilibre. Le couple requis est enregistré et correspond, après un étalonnage à l'aide de poids, à la pression de vapeur de la substance.

Pour les mesures suivantes, la température est augmentée par petits intervalles jusqu'au moment où la plus haute valeur choisie est atteinte. L'échantillon est alors refroidi une nouvelle fois et une deuxième courbe de pression de vapeur peut être enregistrée. Les deux séries de mesures ne seront reproductibles que si l'échantillon est suffisamment pur. Si la troisième tentative ne confirme pas les résultats de la deuxième, il est possible que la substance se décompose aux températures choisies pour la détermination.

1.6.5. Méthode de saturation des gaz

1.6.5.1. Appareil

L'appareil utilisé dans la présente méthode comporte un certain nombre d'éléments qui sont schématisés à la figure 5 et décrits ci-après (1).

Gaz inerte:

Le gaz porteur ne doit pas réagir avec la substance à l'essai.

L'azote convient dans la plupart des cas, mais d'autres gaz peuvent parfois être utilisés. De toute façon, le gaz choisi doit être sec (voir figure 5 numéro 4: Sonde d'humidité relative).

Contrôle du flux gazeux :

Un système adéquat de contrôle des gaz est indispensable pour assurer un flux constant et suffisant à travers la colonne de saturation.

Collecteurs de vapeur :

Leur choix dépend des caractéristiques de l'échantillon, ainsi que de la méthode d'analyse utilisée. La vapeur doit être recueillie quantitativement et sous une forme qui permet l'analyse ultérieure. Pour certaines substances, on utilisera des collecteurs contenant des liquides tels que l'hexane ou l'éthylène glycol. Pour d'autres, on recourra à des absorbants solides.

Échangeur de chaleur :

Pour des déterminations à différentes températures, il peut être nécessaire de prévoir un échangeur de chaleur.

Colonne de saturation :

Après avoir été mise en solution, la substance est répartie sur un support inerte qui est ensuite introduit dans la colonne de saturation. Les dimensions de celle-ci et la vitesse d'écoulement doivent être choisies de façon à assurer la saturation complète du gaz porteur. De plus, la colonne doit être thermostatisée. Pour les déterminations s'effectuant à des températures supérieures à 20 °C, l'espace entre la colonne et les collecteurs doit être chauffé pour empêcher la condensation de la substance.

1.6.5.2. Méthode de mesure**Préparation de la colonne de saturation :**

Après mise en solution dans un solvant très volatil, une partie de la substance à l'essai est ajoutée à un volume donné du matériau de support. La quantité de substance ajoutée doit être suffisante pour maintenir la saturation pendant toute la durée de l'essai. Le solvant est complètement évaporé à l'air ou dans un évaporateur rotatif et le matériau bien homogénéisé est introduit dans la colonne. Une fois l'échantillon thermostatisé, un courant d'azote sec est envoyé à travers l'appareil.

Mesure :

Les collecteurs sont connectés aux tubes de sortie de la colonne et le temps est enregistré et est mis en marche. Le débit est vérifié au début de l'expérience et à intervalles réguliers en cours d'expérience, grâce à un débitmètre à bulles (ou encore, en continu, à l'aide d'un débitmètre massique).

Il faut mesurer la pression à la sortie de la colonne de saturation soit :

- a) en intercalant une jauge de pression entre le saturateur et les collecteurs (ceci en raison de l'accroissement de l'espace mort et de la surface d'adsorption);
- ou
- b) en déterminant les baisses de pression à travers le système de collecte utilisé, en fonction du débit dans une expérience séparée (cette méthode peut se révéler peu satisfaisante pour les barboteurs à liquide).

Le temps qu'il faut pour recueillir la quantité de substance nécessaire aux différentes méthodes d'analyse est déterminé au cours d'essais préliminaires ou par estimation. Avant de calculer la pression de vapeur à une température donnée, il y a lieu d'effectuer des essais préliminaires pour déterminer le débit maximal qui saturera complètement le gaz porteur avec la vapeur de la substance. Il faut pour cela que le gaz porteur passe dans le saturateur suffisamment lentement pour qu'aucune vitesse inférieure ne fournisse de pression de vapeur calculée plus importante.

Le choix de la méthode d'analyse sera fonction de la nature de la substance à tester (par exemple chromatographie en phase gazeuse ou gravimétrie).

La quantité de substance transportée par un volume connu de gaz porteur est déterminée.

1.6.5.3. Calcul de la pression de vapeur

La pression de vapeur est calculée à partir de la densité de vapeur (m/V) au moyen de l'équation suivante:

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

où

- p = pression de vapeur en (Pa)
m = masse de la substance adsorbée en (g)
V = volume de gaz saturé en (m³)
R = constante molaire des gaz parfaits (J/mol · K)
T = température en (K)
M = masse molaire en (g/mol).

Les volumes mesurés doivent être corrigés pour tenir compte des différences de pression et de température entre le débitmètre et le saturateur thermostatisé. Si le débitmètre est placé en aval du collecteur de vapeur, des corrections peuvent être nécessaires pour tenir compte de l'évaporation éventuelle des produits contenus dans les collecteurs (1).

2. DONNÉES

Quelle que soit la méthode choisie, la pression de vapeur doit être déterminée à deux niveaux de température au moins. Trois niveaux ou plus sont préférables entre 0 °C et 50 °C, pour vérifier la linéarité de la courbe de la pression de vapeur.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Il y a lieu d'inclure dans le protocole, si possible, les précisions suivantes:

- description précise de la substance (identité et impuretés),
- au moins deux valeurs pour la pression de vapeur et la température, de préférence entre 0 °C et 50 °C. On doit également inclure toutes les données brutes et une courbe log p en fonction de 1/T. De plus, une estimation de la pression de vapeur à 20 °C ou à 25 °C est nécessaire,

En cas de modification (changement d'état, décomposition):

- description de la modification,
- température à laquelle survient celle-ci à la pression atmosphérique,
- pression de vapeur à 10 °C et à 20 °C en dessous de la température de transformation, ainsi qu'à 10 °C et 20 °C au-dessus de cette température (sauf en cas de passage de l'état solide à l'état gazeux).

Toutes les informations et remarques utiles à l'interprétation des résultats doivent être signalées.

La méthode utilisée doit être précisée.

4. RÉFÉRENCES

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

Appendice

Figure 1

Appareil de détermination de la pression de vapeur, suivant la méthode dynamique

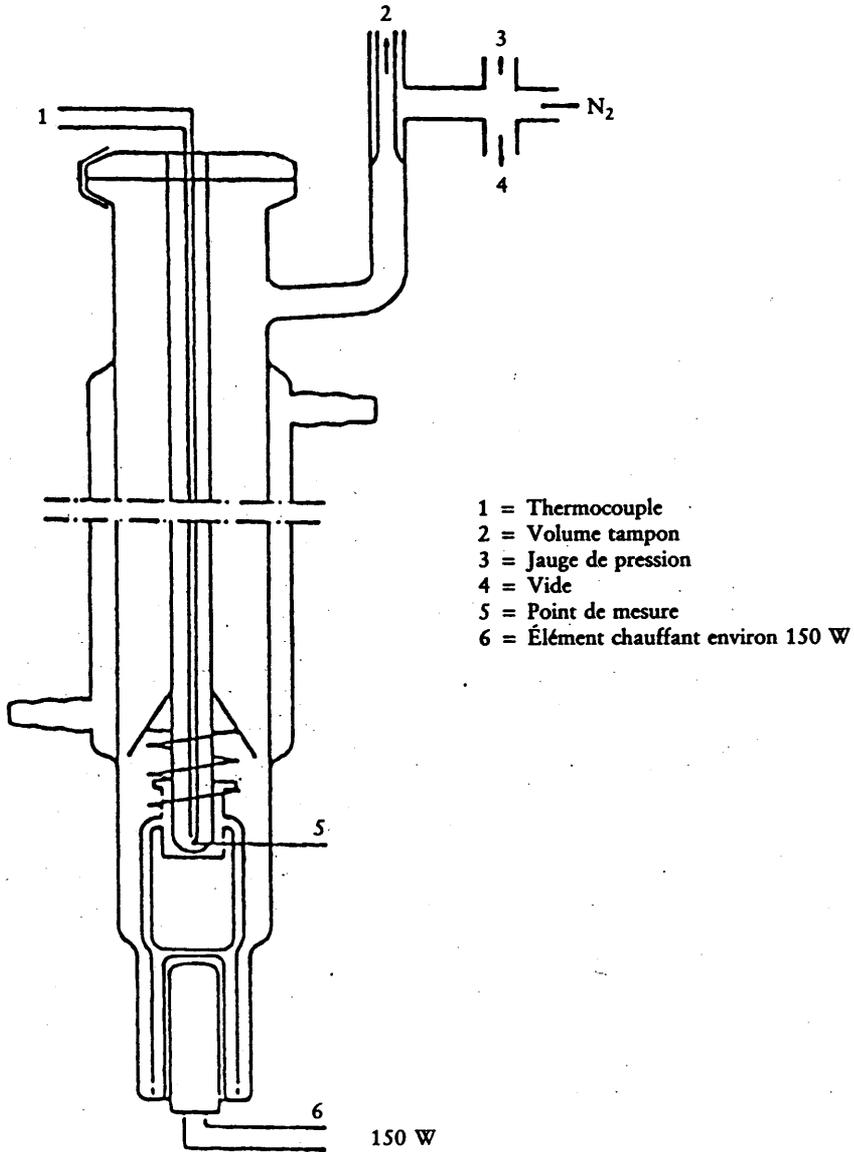


Figure 2

Appareil de détermination de la pression de vapeur suivant la méthode statique

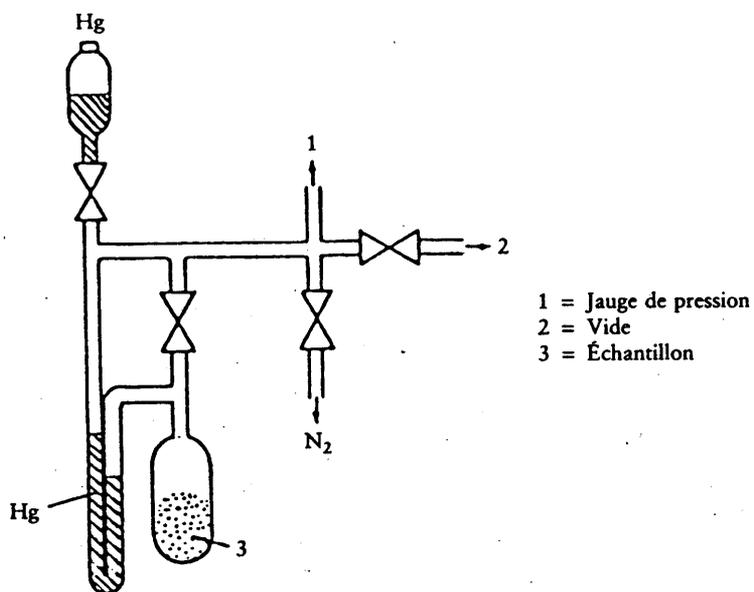


Figure 3

Isoténiscope
 Référence (2)

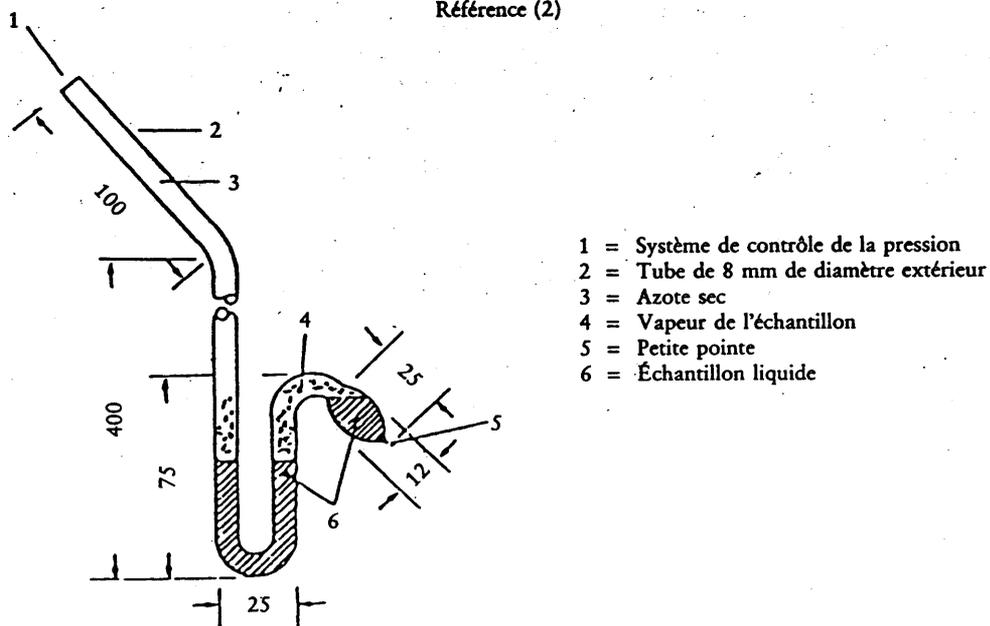
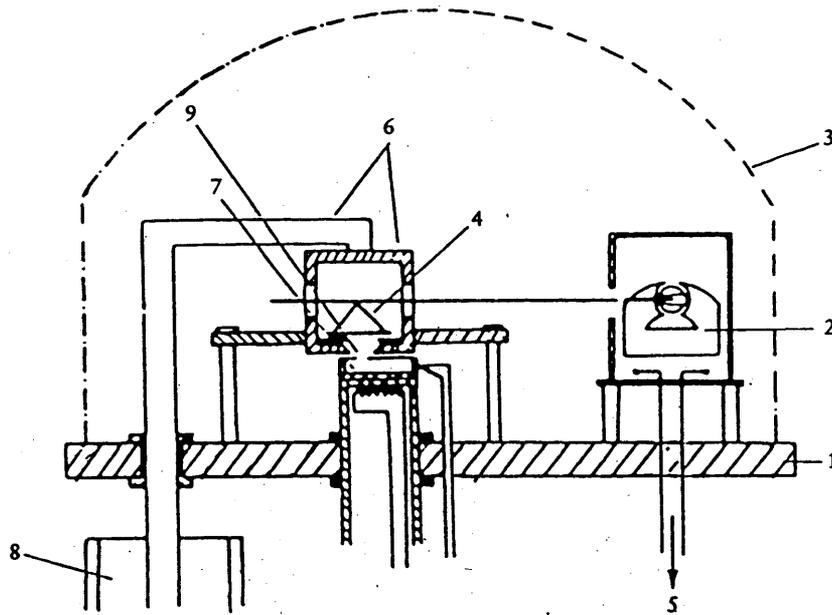


Figure 4

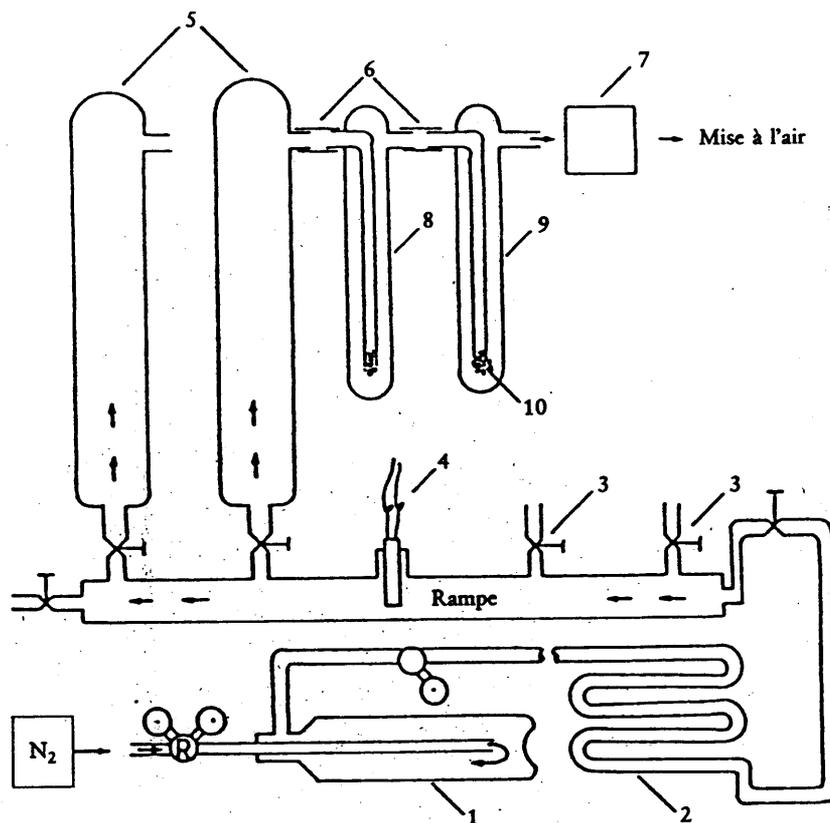
Appareil de détermination de la courbe de pression de vapeur, suivant la méthode de la balance de pression de vapeur



- 1 = Plateau de base
- 2 = Instrument à ressort mobile
- 3 = Cloche de protection
- 4 = Balance à plateau
- 5 = Dispositif de mesure du vide
- 6 = Enceinte de réfrigération
- 7 = Four d'évaporation
- 8 = Dewar contenant de l'azote liquide
- 9 = Bouclier

Figure 5

Modèle d'appareil permettant la détermination de la pression de vapeur, par la méthode de saturation des gaz



- 1 = Régulateur de flux
- 2 = Échangeur de chaleur
- 3 = Soupapes à pointeau
- 4 = Sonde d'humidité relative
- 5 = Colonnes de saturation
- 6 = Joints PTFE
- 7 = Débitmètre
- 8 = Collecteur (absorbant)
- 9 = Collecteur (huile)
- 10 = Débitmètre à bulles de gaz

A. 5. TENSION SUPERFICIELLE

1. MÉTHODE

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Les méthodes décrites s'appliquent à la mesure de la tension superficielle des solutions aqueuses.

Avant d'effectuer ces essais, il sera bon d'avoir des informations préliminaires sur la solubilité dans l'eau, la structure, les propriétés de la substance en matière d'hydrolyse et la concentration critique pour la formation des micelles.

Les méthodes suivantes s'appliquent à la plupart des substances chimiques quel que soit leur degré de pureté.

La mesure de la tension superficielle par la méthode du tensiomètre à anneau est limitée aux solutions aqueuses ayant une viscosité dynamique inférieure à 200 mPa s environ.

1.2. Définitions et unités

L'enthalpie libre de surface par unité de surface constitue la tension superficielle. Cette dernière s'exprime par :

N/m (en unités SI) ou

mN/m (en sous-unités SI)

1 N/m = 10^3 dynes/cm

1 mN/m = 1 dyne/cm dans le système CGS dont l'utilisation n'est plus autorisée.

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. On doit essentiellement s'en servir pour étalonner la méthode de temps à autre et pour pouvoir comparer les résultats lorsqu'une autre méthode est appliquée.

Des substances de référence couvrant une vaste gamme de tensions superficielles sont données dans les références (1) et (2).

1.4. Principe des méthodes

Les méthodes sont basées sur la mesure de la force maximale qu'il faut exercer verticalement sur un étrier ou un anneau en contact avec la surface du liquide étudié, placé dans un récipient approprié, afin de le séparer de cette surface, ou sur une plaque, dont un des bords est en contact avec la surface, afin d'assurer l'arrachement du film formé.

1.5. Critères de qualité

La méthode fournit une plus grande précision que ce qui est probablement requis pour le contrôle de la protection de l'environnement.

1.6. Description des méthodes

1.6.1. Méthode de la plaque

Voir ISO 304 (Substances tensio-actives — détermination de la tension superficielle par arrachement des films liquides).

1.6.2. *Méthode de l'étrier*

Voir ISO 304 (Substances tensio-actives — détermination de la tension superficielle par arrachement des films liquides).

1.6.3. *Méthode de l'anneau*

Voir ISO 304 (Substances tensio-actives — détermination de la tension superficielle par arrachement des films liquides).

1.6.4. *Méthode de l'anneau harmonisée OCDE*

1.6.4.1. Appareil

Des tensiomètres commerciaux se prêtent à cette mesure. Ils comportent les éléments suivants:

- un porte-échantillon mobile,
- un dynamomètre,
- un corps de mesure (anneau),
- un récipient de mesure.

1.6.4.1.1. Porte-échantillon mobile.

Le porte-échantillon mobile sert de support au récipient de mesure thermostaté, qui contient le liquide à essayer. Il est monté sur le même socle que le dynamomètre.

1.6.4.1.2. Dynamomètre.

Le dynamomètre (voir figure) est placé au-dessus du porte-échantillon. L'erreur dans la mesure de la force ne doit pas dépasser $\pm 10^{-6}$ N, ce qui équivaut à une limite d'erreur de $\pm 0,1$ milligramme dans une mesure de masse. Dans la plupart des cas, l'échelle de mesures des tensiomètres vendus dans le commerce est étalonnée en mN/m, si bien que l'on peut lire directement la tension superficielle en mN/m avec précision de 0,1 mN/m.

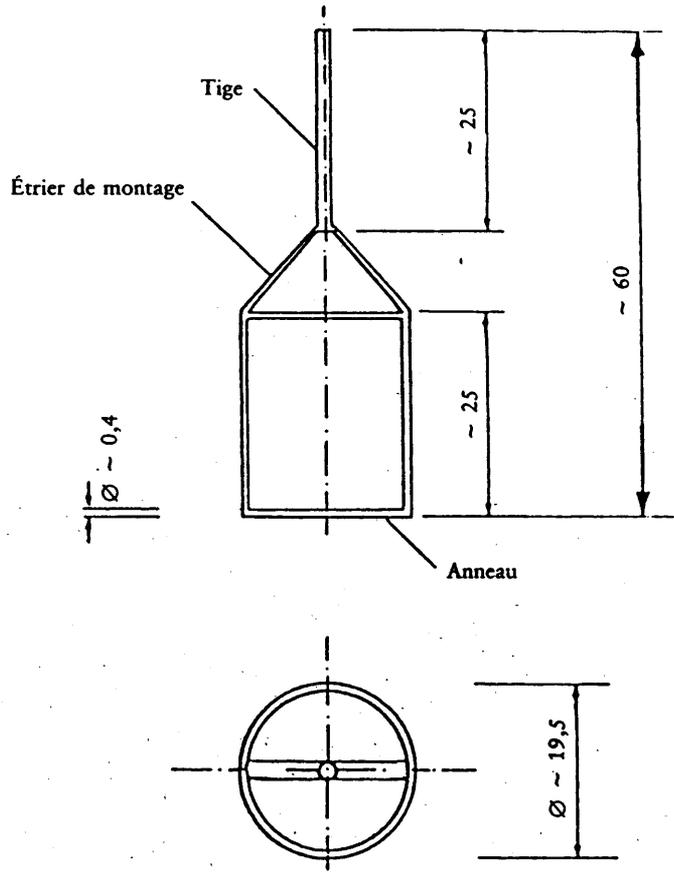
1.6.4.1.3. Corps de mesure (anneau)

L'anneau est habituellement constitué par un film de platine ou de platine-iridium ayant une épaisseur de 0,4 millimètres environ et une circonférence moyenne de 60 millimètres. Cet anneau est suspendu horizontalement à l'étrier de montage qui est relié par une tige métallique au dynamomètre (voir figure).

Figure

Corps de mesure

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



1.6.4.1.4. Récipient de mesure

Le récipient de mesure qui contient la solution à tester doit être un récipient en verre thermostatisé. Il doit être conçu de telle sorte que, au cours de la détermination, la température du liquide et de la phase gazeuse au-dessus de sa surface reste constante et qu'il n'y ait pas d'évaporation. Des récipients cylindriques en verre d'un diamètre intérieur d'au moins 45 millimètres répondent à ces exigences.

1.6.4.2. Préparation de l'appareil

1.6.4.2.1. Nettoyage

Les récipients en verre doivent être nettoyés avec soin. Le cas échéant, ils seront lavés au mélange sulfochromique, puis à l'acide phosphorique sirupeux (83 à 98 % en poids de H_3PO_4), rincés abondamment à l'eau courante et ensuite à l'eau bidistillée jusqu'au moment où l'on obtient une réaction neutre, et enfin séchés ou bien rincés avec une partie du liquide à mesurer.

L'anneau sera tout d'abord rincé abondamment à l'eau courante pour éliminer toutes les traces de substances solubles dans l'eau, plongé quelques secondes dans le mélange sulfochromique, rincé à l'eau bidistillée jusqu'à ce que l'on obtienne une réaction neutre et enfin rapidement séché au-dessus d'une flamme de méthanol.

Note

Les traces de substances qui ne sont pas dissoutes ou détruites par l'acide chromosulfurique ou l'acide phosphorique, telles que les silicones, doivent être éliminées à l'aide d'un solvant organique approprié.

1.6.4.2.2. Étalonage de l'appareil

La vérification de l'appareil consiste à vérifier le point zéro et à le régler de telle sorte que l'indication donnée par l'appareil permette une détermination fiable en mN/m.

Montage :

L'appareil sera mis à niveau, par exemple par emploi d'un niveau à bulle placé sur le socle et de vis de réglage.

Réglage du point zéro :

Après montage de l'anneau sur l'appareil et avant son immersion dans le liquide, l'indicateur du tensiomètre doit être réglé à zéro; on vérifiera le parallélisme de l'anneau en utilisant la surface du liquide comme miroir.

Étalonnage :

L'étalonnage de l'appareil peut être effectué par l'une des deux méthodes suivantes :

- a) à l'aide d'une masse : ce procédé utilise des cavaliers de masse connue (entre 0,1 g et 1,0 g), qui sont placés successivement sur l'anneau. Le facteur d'étalonnage Φ_a , par lequel il y a lieu de multiplier toutes les lectures de l'instrument, sera déterminé au moyen de l'équation (1) :

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

où

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

m = masse du cavalier (g)

g = accélération de la pesanteur (981 cm·s⁻² au niveau de la mer)

b = circonférence moyenne de l'anneau (cm)

σ_a = lecture du tensiomètre après placement du cavalier sur l'anneau (mN/m);

- b) à l'aide d'eau : ce procédé utilise de l'eau pure dont la tension superficielle par exemple, à 23 °C est égale à 72,3 mN/m. Il est plus rapide que l'étalonnage à l'aide de cavaliers, mais il comporte toujours le risque que la tension superficielle de l'eau soit modifiée par des traces de substances tensio-actives.

Le facteur d'étalonnage Φ_b , par lequel il faut multiplier toutes les lectures de l'appareil, sera déterminé à l'aide de l'équation ci-après (2) :

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

où

σ_o = valeur donnée dans la littérature pour la tension superficielle de l'eau (mN/m) à la température choisie pour l'essai

σ_g = valeur mesurée de la tension superficielle de l'eau (mN/m) à cette même température.

1.6.4.3. Préparation des échantillons

Les solutions aqueuses de la substance seront préparées compte tenu des concentrations requises. Il est impératif que la dissolution de la substance soit complète.

La solution ainsi préparée doit être maintenue à une température constante ($\pm 0,5$ °C). Étant donné que la tension superficielle d'une solution placée dans le récipient de mesure se modifie après un certain

temps, plusieurs mesures doivent être effectuées à des moments différents et il faut tracer une courbe donnant la tension superficielle en fonction du temps. Lorsqu'il n'y a plus de modifications, on a atteint un état d'équilibre.

La poussière ou les vapeurs d'autres substances faussent la mesure. Le travail doit donc s'effectuer sous une cloche de protection.

1.6.5. *Conditions de l'essai*

Les mesures doivent être effectuées à une température de 20 °C environ, sans variation de température supérieure à $\pm 0,5$ °C.

1.6.6. *Déroulement de l'essai*

On versera dans le récipient de mesure soigneusement nettoyé la solution à mesurer en prenant soin d'éviter la formation de mousse; ensuite, le récipient de mesure sera placé sur le porte-échantillon qui sera élevé jusqu'à ce que l'anneau soit immergé en dessous de la surface de la solution. Le porte-échantillon est alors réabaissé graduellement et uniformément (à une vitesse d'environ 0,5 centimètre par minute) pour retirer l'anneau de la surface du liquide et ce, jusqu'à ce qu'une force maximale soit atteinte. La couche du liquide accrochée à l'anneau ne doit pas s'en détacher. Les mesures une fois achevées, l'anneau sera immergé à nouveau à la surface et les mesures répétées jusqu'à ce que l'on parvienne à une tension superficielle constante. À chaque détermination, le temps écoulé depuis le transfert de la solution dans le récipient de mesure sera enregistré. Des lectures seront effectuées à la valeur maximale de la force nécessaire pour retirer l'anneau de la surface du liquide.

2. **DONNÉES**

Pour calculer la tension superficielle, on multipliera tout d'abord la valeur lue sur l'appareil en mN/m par le facteur d'étalonnage Φ_0 ou Φ_1 (selon la procédure d'étalonnage utilisée). On obtiendra alors une valeur qui n'est qu'une approximation et doit donc ensuite être corrigée.

Harkins et Jordan (3) ont établi de manière empirique des facteurs de correction pour les valeurs de tension superficielle obtenues par la méthode de l'anneau, facteurs qui dépendent des dimensions de l'anneau, de la densité du liquide et de sa tension superficielle.

Étant donné le travail qu'exige la détermination du facteur de correction propre à chaque mesure à partir des tables de Harkins & Jordan, l'utilisation d'une procédure simplifiée de lecture directe de la tension superficielle corrigée à partir du tableau ci-après est autorisée pour les solutions aqueuses. (On recourra à l'interpolation pour les lectures qui se situent entre deux valeurs du tableau.)

TABLEAU: CORRECTION DES VALEURS MESURÉES DE LA TENSION SUPERFICIELLE

Valable seulement pour les solutions aqueuses: $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (rayon moyen de l'anneau)

r = 0,185 mm (rayon du fil constituant l'anneau)

Valeur expérimentale (mN/m)	Valeur corrigée (mN/m)	
	Étalonnage à l'aide de cavaliers [voir point 1.6.4.2.2 lettre a)]	Étalonnage à l'aide d'eau [voir point 1.6.4.2.2 lettre b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Ce tableau a été établi sur la base de la correction de Harkins-Jordan et correspond à celle de la norme DIN (DIN 53914) concernant l'eau et les solutions aqueuses (densité $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$), et pour un anneau vendu dans le commerce dont les dimensions sont R = 9,55 millimètres (rayon moyen de l'anneau) et r = 0,185 millimètres (rayon du fil constituant l'anneau). Le tableau donne les valeurs corrigées des mesures de tension superficielle effectuées après un étalonnage au moyen de cavaliers ou d'eau pure.

Une autre solution consiste, sans étalonnage préalable, à calculer la tension superficielle selon la formule suivante:

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

où

F = la force mesurée sur le dynamomètre au point de rupture du film

R = le rayon de l'anneau

f = le facteur de correction (1).

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le rapport doit contenir, si possible, les informations suivantes:

- la méthode utilisée: méthode harmonisée au tensiomètre à anneau, ISO ou OCDE,
- le type d'eau ou de solution utilisée,
- la description précise de la substance testée (identité et impuretés),
- les résultats des mesures: tension superficielle (lue) comportant à la fois les différentes lectures et leur moyenne arithmétique, ainsi que la valeur moyenne corrigée (compte-tenu du facteur d'équipement et du tableau de correction),
- la concentration de la solution,
- la température de l'essai,
- l'âge de la solution utilisée, en particulier le temps écoulé entre la préparation de la solution et sa mesure,
- l'évolution de la tension superficielle de la solution en fonction du temps à partir du moment où elle a été transférée dans le récipient de mesure,
- toutes les informations et observations présentant un intérêt pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, notamment en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

4. RÉFÉRENCES

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

A. 6. HYDROSOLUBILITÉ

1. MÉTHODES

Les méthodes décrites sont basées sur les lignes directives de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Il est utile de disposer d'informations sur la formule développée, la pression de vapeur, la constante de dissociation et l'hydrolyse (fonction du pH) de la substance pour réaliser cet essai.

Une seule méthode ne suffit pas à couvrir toute la gamme des solubilités dans l'eau,

La méthode n'est pas applicable aux substances volatiles.

Les deux méthodes d'essais décrites ci-après permettent de couvrir cette gamme :

- la première, dénommée ci-après « méthode par élution sur colonne », s'applique aux substances essentiellement pures, à faible solubilité ($< 10^{-2}$ g/l) et stables dans l'eau,
- la deuxième, dénommée ci-après « méthode du flacon », s'applique aux substances essentiellement pures, à solubilité élevée ($> 10^{-2}$ g/l) et stables dans l'eau.

L'hydrosolubilité de la substance testée peut être considérablement affectée par la présence d'impuretés.

1.2. Définitions et unités

L'hydrosolubilité d'une substance est la concentration massique de saturation de la substance dans l'eau à une température donnée. Elle s'exprime en unités de masse par volume de solution.

L'unité SI est le kg/m^3 (g/l peut être également utilisé).

1.3. Substances de référence

Les substances de référence ne doivent pas nécessairement être utilisées dans tous les cas lorsque l'on analyse une nouvelle substance. Elles doivent servir essentiellement à contrôler de temps à autre la qualité de la méthode et à permettre la comparaison des résultats lorsqu'une autre méthode est utilisée.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La quantité approximative d'échantillon et le temps nécessaire à obtenir la concentration massique de saturation doivent être déterminés par un essai préliminaire simple.

1.4.1. Méthode par élution sur colonne

Cette méthode est basée sur l'élution de la substance d'essai avec de l'eau à partir d'une micro-colonne remplie avec un matériau support inerte tel que billes de verre, gel de silice ou sable, et chargée avec un excès de substance à tester. L'hydrosolubilité est déterminée lorsque la concentration massique de l'éluat est constante. Elle est indiquée par un plateau de concentration en fonction du temps.

1.4.2. Méthode du flacon

En ce qui concerne cette méthode, la substance (les solides doivent être pulvérisés) est dissoute dans l'eau à une température quelque peu supérieure à la température d'essai. Lorsque la saturation est atteinte, le mélange est refroidi, maintenu à la température d'essai et agité jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (2). Après quoi, la concentration massique de la substance dans la solution aqueuse, qui ne doit contenir aucune particule non dissoute est déterminée suivant une méthode analytique appropriée.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Répétabilité

Pour ce qui a trait à la méthode par élution sur colonne, la répétabilité susceptible d'être obtenue est inférieure à 30 % ; quant à la méthode du flacon, on doit observer une répétabilité inférieure à 15 %.

1.5.2. Sensibilité

Elle dépend de la méthode d'analyse, mais la concentration massique peut être déterminée jusqu'à 10^{-6} g/l au moins.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Conditions de l'essai

L'essai doit être effectué de préférence à $20 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Si l'on craint une incidence de la température dans la solubilité ($> 3 \text{ % / °C}$), on utilisera également deux autres températures, supérieure et inférieure d'au moins 10 °C à la température initiale choisie. Dans ce cas, la température doit être ajustée à $\pm 0,1 \text{ °C}$. La température choisie sera maintenue constante dans toutes les parties de l'appareillage où la température peut avoir une influence.

1.6.2. Essai préliminaire

Dans une éprouvette jaugée de 10 millilitres bouchée, ajouter à 0,1 gramme environ d'échantillon (les substances solides doivent être réduites en poudre) des volumes croissants d'eau distillée à température ambiante, suivant la progression indiquée au tableau ci-après :

0,1 g soluble dans «x» ml d'eau	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
solubilité approximative (g/l)	> 1 000	1 000—200	200—100	100—50	50—10	10—1	< 1

Après chaque addition de la quantité d'eau indiquée, agiter vigoureusement le mélange pendant dix minutes, puis vérifier visuellement s'il contient des particules d'échantillon non dissoutes. Si, après addition de 10 millilitres d'eau, l'échantillon ou certaines parties de celui-ci n'est pas dissous, transférer le contenu de l'éprouvette graduée dans une éprouvette graduée de 100 millilitres ; la remplir complètement d'eau et agiter. Si la solubilité est faible, le temps nécessaire pour dissoudre la substance peut être considérablement plus long (24 heures sont à prévoir). La solubilité approximative est indiquée, au tableau, sous le volume d'eau ajouté dans lequel s'effectue la dissolution complète de l'échantillon. Si la substance reste, selon toute apparence, insoluble, procéder à une nouvelle dilution afin de déterminer s'il y a lieu d'utiliser la méthode par élution sur colonne ou la méthode par solubilité en flacon.

1.6.3. Méthode par élution sur colonne

1.6.3.1. Matériau support, solvant et éluant

Dans la méthode par élution sur colonne, le matériau support doit être inerte. On pourra employer à cet effet des billes de verre ou de la silice. Pour appliquer la substance d'essai au support, on utilisera un solvant de l'eau bidistillée provenant d'un appareillage en verre ou en quartz.

Remarque

Ne pas utiliser l'eau provenant directement d'un échangeur d'ions organique.

1.6.3.2. Charge en matériau support

Peser et transférer 600 milligrammes environ de matériau support dans un ballon à fond rond de 50 millilitres.

Dissoudre une quantité pesée appropriée de substance à soumettre à essai dans le solvant choisi. Ajouter au support une quantité adéquate de la solution de la substance à tester. Le solvant doit être complètement évaporé, par exemple dans un évaporateur rotatif, afin d'assurer la saturation en eau du support, saturation qui, sinon, ne se ferait pas en raison de l'effet de répartition à la surface.

L'enrobage du support peut poser des problèmes (résultats erronés) si la substance d'essai est déposée sous forme d'huile ou en une phase cristalline différente. Le problème devrait être examiné expérimentalement.

Laisser tremper le support ainsi introduit pendant approximativement 2 heures dans 5 millilitres environ d'eau, puis transférer la suspension dans la microcolonne. On pourra également verser dans cette dernière le support chargé à sec, la microcolonne ayant été préalablement remplie d'eau puis équilibrée pendant 2 heures environ.

Mode opératoire:

L'élution de la substance à partir du support peut s'effectuer selon deux systèmes différents:

- pompe de circulation (voir figure 1),
- réservoir d'eau (voir figure 4).

1.6.3.3. Méthode par élution sur colonne avec pompe de recirculation

Appareillage:

Une configuration schématique d'un système couramment utilisé est indiquée à la figure 1. La figure 2 montre une microcolonne appropriée, bien que toute autre dimension soit acceptable, à condition de satisfaire aux critères de reproductibilité et de sensibilité. La colonne doit avoir un volume tampon correspondant au moins à 5 volumes de lit support, plus un minimum de cinq échantillons. On peut cependant réduire la dimension si on utilise un appoint de solvant pour remplacer les cinq volumes précités, éliminés avec les impuretés.

La colonne doit être reliée à une pompe de recyclage capable d'assurer un débit approximatif de 25 millilitres par heure. Cette pompe est équipée de raccords en polytétrafluoroéthylène et/ou verre. La colonne et la pompe, lorsqu'elles sont couplées doivent pouvoir permettre l'échantillonnage de l'effluent et l'équilibrage à pression atmosphérique du réservoir. Le matériau dans la colonne est soutenu par un petit tampon de laine de verre (5 mm) qui sert également à filtrer les particules. Comme pompe de recirculation on pourra utiliser, notamment une pompe péristaltique (veiller à ce qu'aucune contamination ni absorption n'affecte le matériau constitutif du tube) ou une pompe à membrane.

Procédé de mesure:

La circulation dans la colonne est amorcée, le débit recommandé est de 25 millilitres par heure approximativement (environ 10 volumes par heure pour la colonne décrite ci-dessus). Les cinq premiers volumes (minimum) sont éliminés afin d'éliminer les impuretés solubles dans l'eau. Après quoi, connecter la pompe de recyclage, faire fonctionner l'appareil jusqu'à atteindre l'état d'équilibre tel qu'il est défini par cinq échantillons successifs dont les concentrations ne diffèrent pas de façon aléatoire de plus de $\pm 30\%$. Ces échantillons doivent être séparés l'un de l'autre par un intervalle de temps correspondant au passage d'au moins 10 volumes de couche support.

1.6.3.4. Méthode par élution sur colonne avec réservoir tampon

Appareillage (voir figures 3 et 4):

Réservoir: le raccordement au réservoir est assuré par un joint rodé, lui-même raccordé à un tube en polytétrafluoroéthylène. Débit recommandé: environ 25 millilitres par heure. Les éluats successifs seront recueillis et analysés suivant la méthode choisie.

Procédé de mesure :

Les fractions provenant de l'intervalle d'élution pour lesquelles les concentrations sont constantes ($\pm 30\%$) dans au moins cinq fractions consécutives seront utilisées pour déterminer l'hydro-solubilité.

On répétera l'opération, le débit étant réduit de moitié. Si les résultats des deux opérations concordent, l'essai est satisfaisant; si l'on constate une solubilité apparemment plus élevée au débit inférieur, on réduira une nouvelle fois celui-ci de moitié jusqu'à ce que deux opérations successives donnent la même solubilité.

Dans les deux cas (pompe de recirculation ou réservoir à eau), déceler dans les fractions la présence éventuelle de matière colloïdale par détection de l'effet Tyndall (diffusion de la lumière). La présence de telles particules fausse les résultats et l'essai doit être répété en améliorant l'action de filtration de la colonne. Noter le pH de chaque échantillon. Effectuer une deuxième opération à la même température.

1.6.4. Méthode par solubilité en flacon**1.6.4.1. Appareillage**

Cette méthode requiert le matériel suivant :

- verrerie et instrumentation normale de laboratoire,
- dispositif approprié pour agiter les solutions à des températures constantes contrôlées,
- si nécessaire, centrifugeuse thermostatée en présence d'émulsion,
- équipement pour la détermination analytique.

1.6.4.2. Procédé de mesure

Évaluer, à partir de l'essai préliminaire, la quantité de produit nécessaire pour saturer le volume d'eau choisie. Celui-ci dépend de la méthode analytique et de l'intervalle de solubilité. Peser environ cinq fois la quantité de matière déterminée ci-avant et l'introduire dans chacun des trois récipients en verre pourvus d'un bouchon, également en verre (par exemple tubes à centrifugeur ballons). Ajouter le volume d'eau choisi dans chaque récipient, que l'on bouchera hermétiquement. Agiter ces récipients bouchés, à 30 °C (utiliser un dispositif agitateur ou mélangeur susceptible d'opérer à température constante, par exemple un agitateur magnétique en bain-marie contrôlé par thermostat). Après une journée, retirer l'un des récipients et rééquilibrer pendant 24 heures à température d'essai; agiter de temps à autre. Le contenu du récipient est ensuite centrifugé à température d'essai et la concentration du composé dans la phase aqueuse limpide est déterminée selon une méthode analytique appropriée. Les deux autres ballons sont traités de la même façon après un premier équilibre à 30 °C pendant deux et trois jours respectivement. Si les concentrations des deux derniers récipients au moins concordent avec la reproductibilité requise, l'essai est satisfaisant. Répéter l'ensemble de l'essai en utilisant des temps d'équilibre plus longs si les résultats des récipients 1, 2 et 3 accusent une tendance à la progression.

Le pH de chaque échantillon doit être noté.

1.6.5. Analyse

Une méthode d'analyse spécifique de la substance est préférable pour ces déterminations, de petites quantités d'impuretés solubles pouvant entraîner des erreurs sensibles dans la solubilité mesurée. Exemples de méthodes: chromatographie en phase gazeuse ou liquide, méthodes titrimétriques, méthodes photométriques, méthodes voltamétriques.

2. DONNÉES**2.1. Méthode par élution sur colonne**

La valeur moyenne déterminée sur au moins cinq échantillons consécutifs prélevés durant le plateau de saturation, doit être calculée pour chaque opération, de même que la déviation standard.

2.2. Méthode du flacon

Les résultats individuels doivent être indiqués pour chacun des trois flacons; on fera la moyenne et on exprimera en unités de masse par volume de solution les résultats considérés comme constants (répétabilité inférieure à 15 %). Cette opération peut exiger la conversion des unités de masse en unités de volume, en utilisant la densité lorsque la solubilité est très élevée (> 100 g/l).

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**3.1. Méthode par élution sur colonne**

Le protocole doit contenir, si possible, l'indication des résultats de l'essai préliminaire, ainsi que les données suivantes:

- description précise de la substance (identité et impuretés),
- concentrations individuelles, débits et pH de chaque échantillon,
- déviations moyenne et standard d'au moins cinq échantillons du plateau de saturation lors de chaque opération,
- moyenne de deux opérations acceptables consécutives,
- température de l'eau pendant le processus de saturation,
- méthode d'analyse utilisée
- nature du support,
- quantité de substance déposée sur le support,
- solvant utilisé,
- mise en évidence des instabilités chimiques éventuelles de la substance pendant l'essai et méthode utilisée,
- toutes données pertinentes pour l'interprétation des résultats.

3.2. Méthode du flacon

Le protocole doit contenir, si possible, les données suivantes:

- description précise de la substance (identité et impuretés),
- résultats analytiques individuels et moyenne lorsque plus d'une valeur est déterminée pour un même récipient,
- pH de chaque échantillon,
- moyenne des valeurs pour les différents ballons en concordance,
- température d'essai,
- méthode analytique utilisée,
- mise en évidence des instabilités chimiques éventuelles de la substance pendant l'essai et méthode utilisée,
- toutes données pertinentes pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

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

Appendice

Figure 1

Schéma du dispositif d'essai

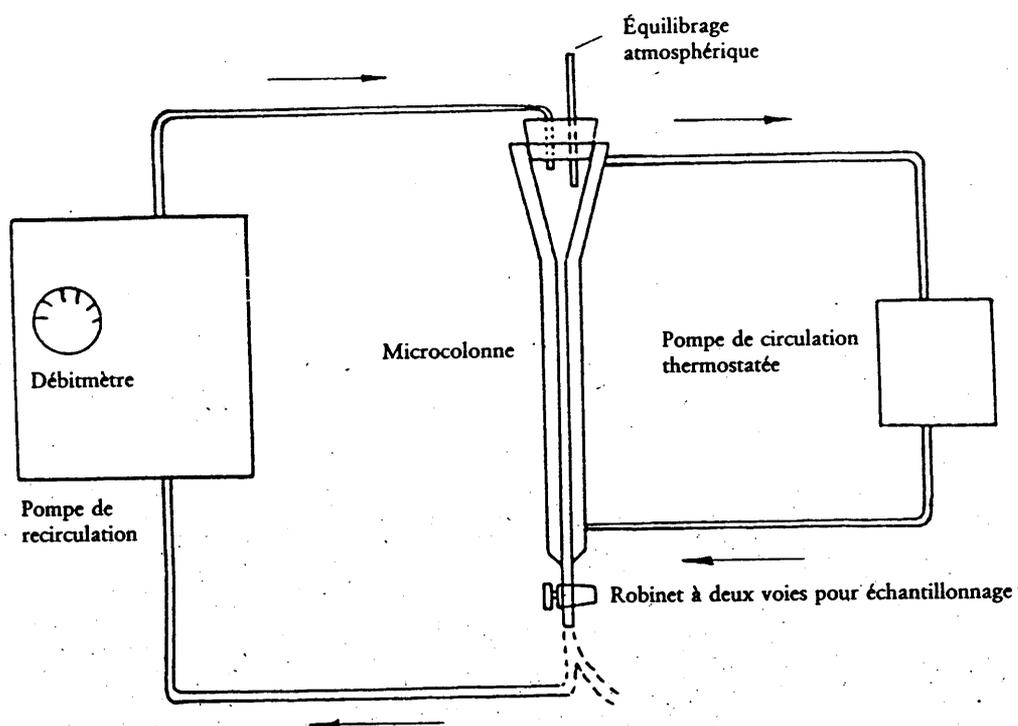


Figure 2

Microcolonne type
(dimensions en millimètres)

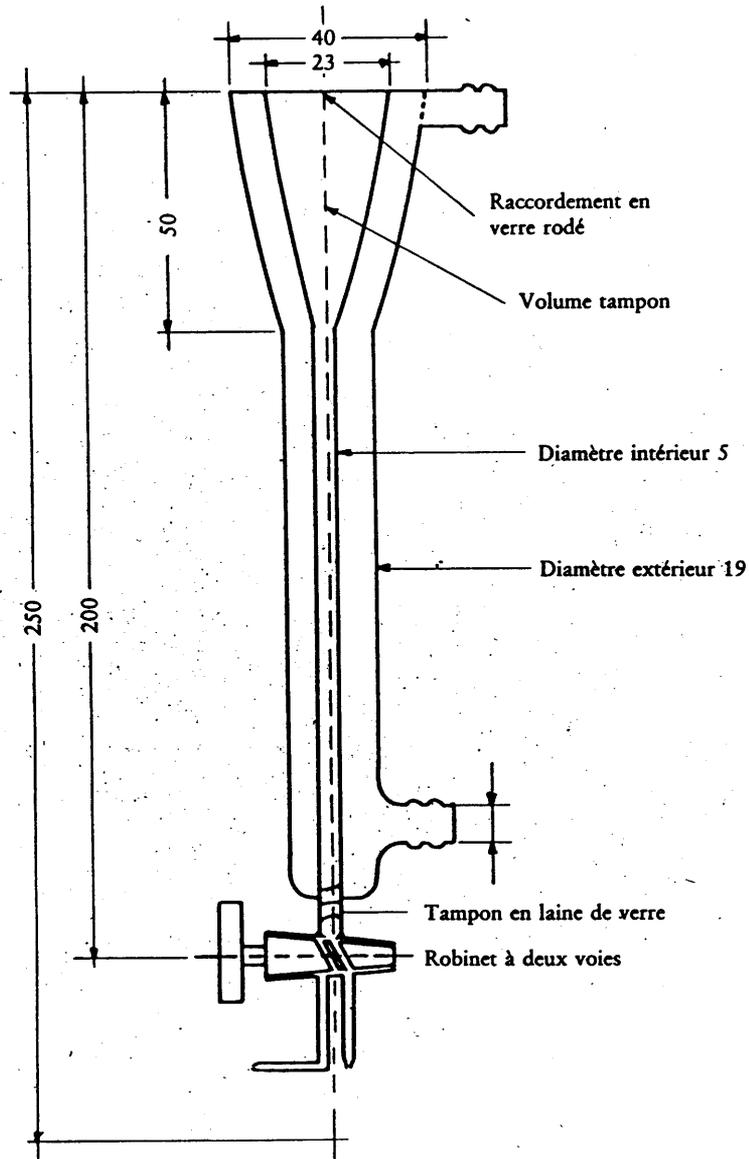


Figure 3

Microcolonne type
(dimensions en millimètres)

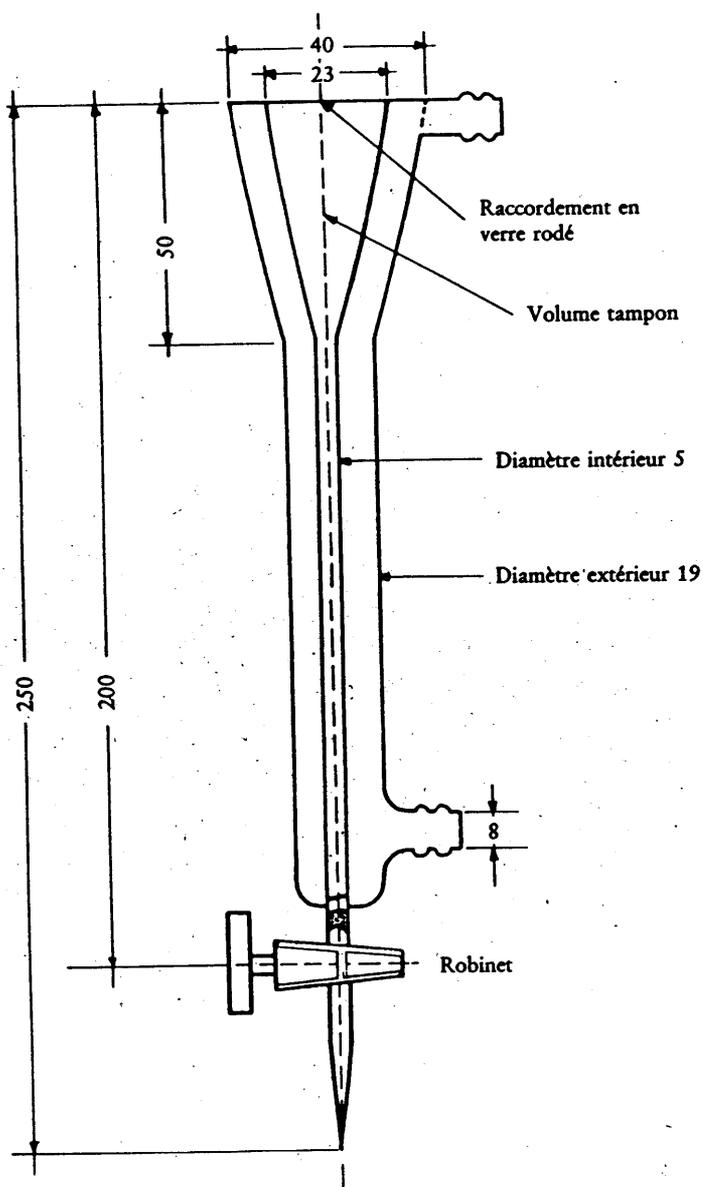
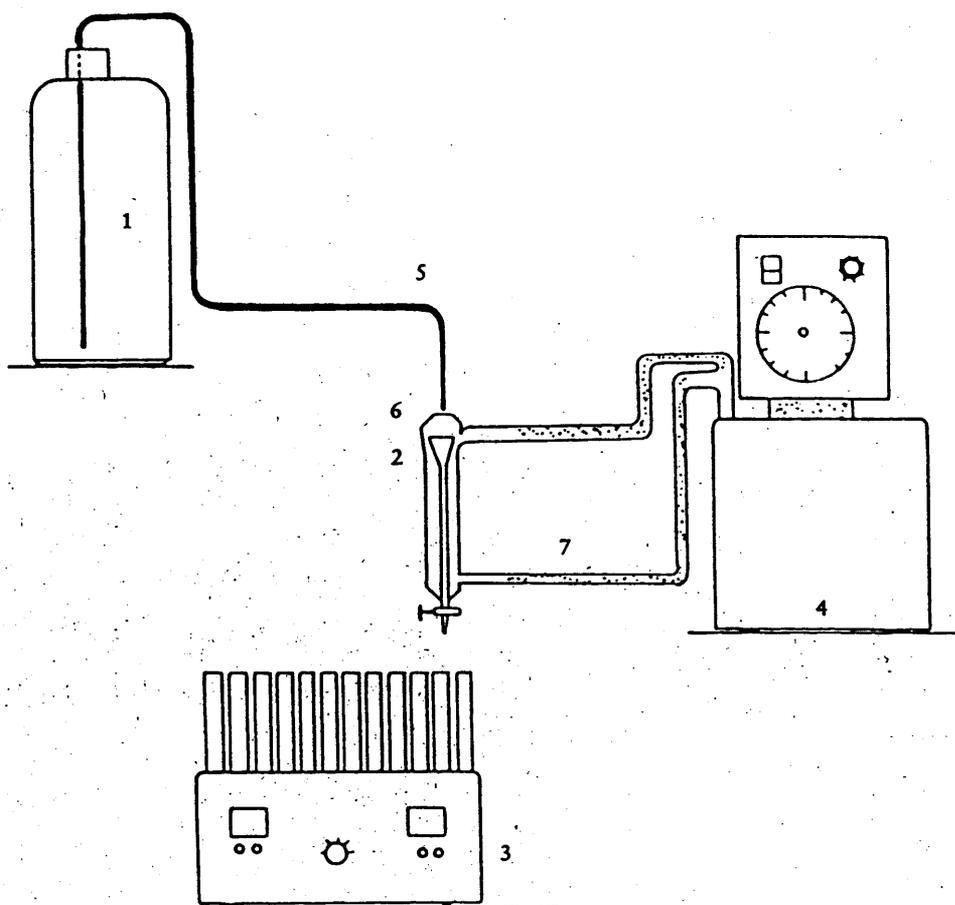


Figure 4

Dispositif d'essai pour la détermination de l'hydrosolubilité de substances légèrement solubles et faiblement volatiles



- 1 = Réservoir à eau par exemple ballon (d'une contenance de 2,5 litres)
- 2 = Colonne (voir figure 3)
- 3 = Collecteur de fractions
- 4 = Thermostat
- 5 = Tuyau en teflon
- 6 = Bouchon rodé en verre
- 7 = Conduite d'eau (entre le thermostat et la colonne, diamètre intérieur 8 millimètres approximativement)

A. 7. LIPOSOLUBILITÉ

1. MÉTHODE

La méthode décrite est basée sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Il est utile, pour réaliser cet essai, de disposer de données préliminaires sur le coefficient de partage, l'hydrosolubilité, la formule développée et la stabilité à 50 °C de la substance. Cette méthode n'est applicable qu'aux substances essentiellement pures, stables à 50 °C et non significativement volatiles dans les mêmes conditions.

Elle ne convient pas pour les substances réagissant avec les triglycérides dans les conditions des essais.

1.2. Définitions et unités

La fraction massique d'une substance qui forme une phase homogène avec une graisse liquide (huile) sans donner lieu à des réactions chimiques est définie comme étant la liposolubilité. La valeur maximale de cette fraction est appelée fraction de saturation, celle-ci est fonction de la température.

La fraction de saturation d'une substance doit être indiquée en milligrammes par 100 grammes de graisse standard à 37 °C ± 0,5 °C.

Le rapport suivant existe entre la solubilité en gramme par 100 grammes de solution (S') et la solubilité en grammes par 100 grammes de solvant (S):

$$S = \frac{100 \times S'}{100 - S'} \text{ g/100 g de graisse standard}$$

En multipliant S par 1 000, on obtient la solubilité en milligrammes par 100 grammes de graisse standard.

1.3. Substances de référence

Les substances de référence ne doivent pas être utilisées nécessairement dans tous les cas lorsqu'on analyse une nouvelle substance. Elles doivent servir essentiellement à vérifier de temps à autre la qualité de la méthode et à permettre de comparer les résultats lorsqu'on utilise une méthode différente.

1.4. Principe de la méthode

La substance est placée dans une «graisse standard» liquide et agitée. La quantité de substance est suffisante pour qu'il y ait excès. La quantité dissoute est déterminée par une méthode analytique appropriée.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Spécificité

La répétabilité de la mesure n'est pas connue à ce jour.

Les résultats s'appliquent aux graisses standard et à des substances relativement pures. Même à 37 °C les graisses peuvent former des émulsions ou des suspensions fines de substances solides. Comme celles-ci interfèrent avec la détermination ultérieure de la fraction massique, la formation de ces mêmes émulsions ou suspensions doit être évitée.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparation

1.6.1.1. Appareillage

Équipement nécessaire:

- verrerie normale de laboratoire,
- balance,
- centrifugeuse thermostatée,
- agitateur équipé d'un système de contrôle de la température,
- thermostat.

1.6.1.2. Graisses standards

L'utilisation de graisses standards est nécessaire. Celles-ci devraient être facilement définissables. Un exemple figure à l'appendice.

1.6.1.3. Essai préliminaire

Un essai préliminaire simplifié doit être effectué pour déterminer la quantité approximative de substance nécessaire pour obtenir la fraction de saturation en masse, à la température d'essai (37 °C).

Note

La vitesse d'obtention de l'équilibre de saturation peut dépendre dans une large mesure de la granulométrie (cas des substances solides). C'est pourquoi ces matières doivent être réduites en poudre.

1.6.1.4. Préparation de la substance

Peser huit échantillons et les verser dans des fioles de 50 millilitres. Normalement la quantité de chacun de ces échantillons doit être le double de celle nécessaire à la saturation, comme déterminé par l'essai préliminaire.

Après addition d'une quantité pesée d'environ 25 grammes de graisse standard liquéfiée et mélangée, fermer hermétiquement les fioles et les agiter. Une moitié (groupe 1) à 30 °C et l'autre moitié (groupe 2) à 50 °C environ, chacune pendant au moins une heure.

1.6.2. Conditions de l'essai

La détermination de la liposolubilité est effectuée à 37 °C ± 0,5 °C.

1.6.3. Méthodologie

Agiter le contenu des fioles des deux groupes à 37 °C ± 0,5 °C jusqu'à mélange parfait.

Le temps d'agitation nécessaire à établir l'équilibre ne peut, en règle générale, être indiqué d'avance. Dans le cas des substances liquides, la saturation peut être atteinte en quelques minutes; dans le cas des substances solides, elle peut prendre des heures. En général, le temps d'agitation ne dépassera pas trois heures. Après quoi, interrompre l'agitation de deux des fioles des deux groupes et laisser reposer celles-ci pendant au moins une heure à 37 °C, de manière à séparer la quantité de substances non dissoute et permettre la formation de la phase homogène. S'il se produit une émulsion ou une suspension (par exemple effet Tyndall), l'éliminer par une méthode appropriée telle que la centrifugation thermostatée.

Agiter la troisième et la quatrième fioles des deux groupes pendant au moins 24 heures, puis les laisser reposer pendant une heure à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

Note:

Si aucun sédiment ne s'est déposé (pour les substances solides), ou si aucune séparation de phase (pour les substances liquides) n'est intervenue après ce laps de temps, l'essai doit être répété avec une quantité accrue de substance.

1.6.4. *Analyse*

Prélever un échantillon de chaque phase de graisse saturée pour l'analyse. Peser cet échantillon et déterminer la fraction dissoute.

Toute méthode analytique appropriée pourra être utilisée, soit directement, soit après extraction à l'eau ou à l'aide d'un solvant organique, ou par toute autre technique de séparation.

Exemples:

- spectrophotométrie,
- chromatographie en phase gazeuse ou liquide,
- voltamétrie.

2. **DONNÉES**

Si les résultats de la sous-saturation ou de la sursaturation, ou suivant que la période est longue ou brève, accusent des différences sensibles, l'essai doit être répété avec des temps d'agitation plus longs.

3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Les données suivantes doivent, si possible, figurer au protocole de l'essai:

- description précise de la substance (identité et impuretés),
- graisse (par exemple: description précise, caractéristiques, origine, composition),
- méthode d'analyse, déviations et caractères particuliers.

Les résultats doivent être évalués comme décrit ci-avant et notés au protocole de l'essai. Si l'on ne constate aucune différence significative entre les valeurs observées en milligrammes par 100 grammes, les valeurs individuelles, la valeur moyenne et la déviation standard seront notées. Si on note des différences significatives, même après un nouvel essai, seuls les résultats individuels seront consignés.

Toutes observations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats seront consignées.

4. **RÉFÉRENCES**

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

Appendice

EXEMPLE DE GRAISSE STANDARD

Le tableau suivant indique la composition d'une graisse standard.

Distribution de l'acide gras

Nombre d'atomes C dans la fraction « acide gras »	6	8	10	12	14	16	18	autres
% (par mesure surface CPG)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,6	8,6	1

Distribution des glycérides

Nombre d'atomes C dans la fraction « acide gras »	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50
% (par mesure surface CPG)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2

Pureté

Teneur en monoglycérides (enzymatique) \leq 0,1 %

Teneur en diglycérides (enzymatique) \leq 0,4 %

Teneur non saponifiable \leq 0,1 %

Indice de Wijs \leq 0,5

Indice d'acide 0,02

Teneur en eau (K. Fisher) \leq 0,1 %

Point de fusion claire 28,5 °C

Spectre d'absorption type (épaisseur de couche $d = 1$ cm, comparaison: eau, 35 °C)

Longueur d'onde (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Transmission (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Au moins 10 % de transmission de la lumière à 303 nm.

Cette graisse est un mélange synthétique de triglycérides saturés, avec une distribution en un acide gras et triglycérides, semblable à celle d'une huile de coco.

A. 8. COEFFICIENT DE PARTAGE

1. MÉTHODE

La méthode décrite est basée sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

Il est utile de disposer de données préliminaires sur la constante de dissociation, l'hydrosolubilité et la tension superficielle de la substance pour exécuter cet essai.

La méthode ne s'applique qu'à des substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et l'n-octanol. Elle n'est pas applicable aux substances tensioactives.

1.2. Définitions et unités

Le coefficient de partage (P) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre (c_i) d'une substance dissoute dans un système biphasique consistant en deux solvants quasiment non miscibles. Dans le cas de l'n-octanol et de l'eau :

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}}$$

Le coefficient de partage (P) est donc le quotient de deux concentrations; il est généralement indiqué sous la forme de son logarithme, base 10 (log P).

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'utiliser des substances de référence dans tous les cas, lorsqu'on analyse une nouvelle substance. Elles doivent servir essentiellement à contrôler de temps à autre la qualité de la méthode et à permettre de comparer les résultats lorsqu'un utilise des méthodes différentes.

1.4. Principes de la méthode

Pour déterminer un coefficient de partage, il y a lieu de parvenir à un équilibre entre l'ensemble des éléments constitutifs du système s'influençant mutuellement et de déterminer les concentrations des substances dissoutes dans les deux phases. Une étude de la littérature sur ce thème fait apparaître qu'il existe de nombreuses techniques, que l'on pourra utiliser pour résoudre ce problème, c'est-à-dire mélange complet des deux phases, suivi de leur séparation afin de déterminer la concentration à l'équilibre de la substance examinée.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Répétabilité

Pour obtenir un coefficient de partage précis, on procédera à des déterminations en double dans trois séries de conditions d'essais différentes, la quantité de substances spécifiée ainsi que le rapport des volumes de solvant pouvant varier. Les valeurs déterminées de ce coefficient, exprimées sous la forme de leurs logarithmes communs doivent se situer dans un intervalle de $\pm 0,3$ unité log.

1.5.2. Sensibilité

L'intervalle de mesure de la méthode est déterminé par la limite de détection du procédé analytique. Cela doit suffire à estimer les valeurs de P_{ow} jusqu'à 10^5 , lorsque la concentration du soluté, dans chaque phase ne dépasse pas 0,01 mol par litre.

1.5.3. Spécificité

La loi de partage de Nernst ne s'applique qu'à température, pression et pH constants pour les solutions diluées. Strictement, elle s'applique à une substance pure dispersée entre deux solvants purs. Les résultats peuvent être affectés par l'apparition simultanée, dans l'une ou dans les deux phases, de plusieurs solutés différents.

La dissociation ou l'association de molécules dissoutes se traduit par des déviations par rapport à la loi de partage citée. Ces déviations s'expliquent par le fait que le coefficient de partage dépend dès lors de la concentration de la solution.

En raison des équilibres multiples en présence, cette méthode d'essai ne doit pas être appliquée sans correction aux composés ionisables (l'utilisation de solutions tampons en lieu et place de l'eau doit être prise en considération pour ces composés).

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Estimation préliminaire du coefficient de partage

La valeur du coefficient de partage peut être estimée, soit par simple calcul (2), soit en utilisant les solubilités de la substance d'essai dans les solvants purs (1).

À cette fin,

$$P_{\text{estimation}} = \frac{\text{saturation } C_{\text{n-octanol}}}{\text{saturation } C_{\text{eau}}}$$

On peut également procéder à une détermination grossière par un essai préliminaire simplifié.

1.6.2. Préparation

n-octanol: la détermination du coefficient de partage doit être effectuée en recourant à un réactif de qualité analytique.

Eau: utiliser de l'eau distillée ou bidistillée provenant d'un appareillage en verre ou en quartz.

Note:

Éviter l'eau prélevée directement à partir d'un échangeur d'ions.

1.6.2.1. Présaturation des solvants

Avant de déterminer un coefficient de partage, les phases du système de solvants sont saturées réciproquement par agitation à température d'essai. Pour ce faire, il est pratique d'agiter pendant 24 heures, dans un agitateur mécanique, deux grands flacons contenant du n-octanol pur de qualité analytique ou de l'eau, avec une quantité suffisante de l'autre solvant, puis de les laisser reposer jusqu'à ce que les phases se séparent et que l'on parvienne à l'état de saturation.

1.6.2.2. Préparation pour l'essai

Le volume liquide doit remplir presque complètement le récipient d'essai afin d'éviter toute perte de matière due à la volatilisation. Le rapport de volume et les quantités de substance à utiliser sont fixés comme suit:

- estimation préliminaire du coefficient de partage (voir ci-avant),
- quantité minimale de substance d'essai requise par le procédé analytique utilisé,
- limite de concentration maximale dans chaque phase de 0,01 mol par litre.

Trois essais seront effectués. Au premier, on ajoute la partie en volume calculée, au deuxième, deux fois le volume de n-octanol et, au troisième, la moitié du volume de n-octanol.

1.6.2.3. Substance d'essai

Pour assurer l'équilibre pendant l'essai, une solution de réserve est préparée dans le n-octanol avec une concentration massique comprise entre 1 et 100 milligrammes par millilitre. La concentration massique réelle de cette solution de réserve doit être déterminée avec précision avant de l'utiliser pour déterminer le coefficient de partage. Cette solution doit être stockée dans des conditions stables.

1.6.3. Conditions de l'essai

La température d'essai doit être maintenue constante ($\pm 1^\circ\text{C}$) et se situer dans l'intervalle de 20°C — 25°C .

1.6.4. Procédé de mesure

1.6.4.1. Établissement de l'équilibre de partage

Pour chaque série de conditions d'essai, préparer des récipients d'essai en double contenant les quantités requises, soigneusement mesurées, des deux solvants ainsi que la quantité nécessaire de solution de réserve.

Mesurer les volumes d'octanol. Placer dans un agitateur approprié, ou agiter à la main les récipients d'essais. Une méthode recommandée consiste à retourner rapidement à 180° le tube à centrifuger autour de son axe transversal, de manière que l'air éventuellement retenu traverse les deux phases.

1.6.4.2. Séparation des phases

Pour séparer les phases, centrifuger le mélange. Effectuer cette opération à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire maintenue à température ambiante ou, si l'on utilise une centrifugeuse sans contrôle de température, rééquilibrer les tubes centrifugeurs à température d'essai au moins une heure avant l'analyse.

1.6.5. Analyse

Pour déterminer le coefficient de partage, il est nécessaire d'analyser les concentrations de la substance d'essai dans les deux phases. Pour ce faire, prélever une portion de chacune des deux phases de chaque tube pour chaque série de conditions d'essai et les analyser suivant le procédé choisi. La quantité totale de substance présente dans les deux phases doit être calculée et comparée avec la quantité de substance initialement introduite.

La phase aqueuse doit être échantillonnée selon un procédé réduisant au minimum le risque d'inclusion de traces d'octanol: on pourrait utiliser à cet effet une seringue en verre à aiguille interchangeable, tout d'abord, remplir partiellement l'air de la seringue, en expulser ensuite doucement l'air tout en insérant l'aiguille dans la couche d'n-octanol. Prélever un volume adéquat de phase aqueuse. Retirer rapidement la seringue de la solution et enlever l'aiguille. Le contenu de la seringue pourra alors être utilisé comme échantillon aqueux. La concentration dans les deux phases distinctes doit être déterminée de préférence par un procédé spécifique à la substance. Exemples de détermination physico-chimique susceptibles de convenir:

- méthodes photométriques,
- chromatographie en phase gazeuse,
- chromatographie en phase liquide haute pression.

2. DONNÉES

Si P_{ow} mesuré est supérieur à 10^4 , il est recommandé de comparer les résultats avec une valeur P_{ow} calculée, obtenue par exemple selon la méthode indiquée en référence (3).

La fiabilité des valeurs déterminées de P peut être vérifiée en procédant à une comparaison de la moyenne des déterminations en double avec la moyenne générale.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Les données suivantes doivent, si possible, figurer au protocole:

- description précise de la substance (identité et impuretés),
- température à laquelle s'est effectuée la détermination,
- procédé analytique utilisé pour déterminer les concentrations,
- concentrations mesurées dans les deux phases pour chaque détermination (consigner par conséquent un total de 12 concentrations),
- poids de la substance d'essai, volume de chaque phase utilisée dans chaque récipient, quantité totale calculée de substance d'essai présente dans chaque phase après équilibrage,
- pour chaque série de conditions d'essai, et au même titre que la moyenne de l'ensemble des déterminations, les valeurs calculées du coefficient de partage (P) et la valeur moyenne. Noter toute dépendance présumée de la concentration vis-à-vis du coefficient de partage,
- la déviation standard des valeurs individuelles de P par rapport à leur moyenne,
- moyenne P de l'ensemble des déterminations exprimée par son logarithme (base 10),
- P_{ow} théorique calculé lorsque cette valeur a été déterminée ou lorsque la valeur mesurée est $> 10^4$,
- pH de l'eau utilisée et de la phase aqueuse durant l'essai,
- toutes observations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

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

A. 9. POINT D'ÉCLAIR

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Pour réaliser cet essai, il est utile de disposer d'informations préliminaires sur l'inflammabilité de la substance. Le mode opératoire est applicable aux substances liquides, sous leur forme commerciale, dont les vapeurs peuvent être enflammées par des sources d'inflammation. Les méthodes d'essai décrites dans le présent document ne sont valables que pour les intervalles de point d'éclair spécifiés dans les méthodes individuelles.

1.2. Définitions et unités

Le point d'éclair est la température, corrigée pour une pression de 101,325 kPa, à laquelle le liquide d'essai dégage des vapeurs dans un récipient d'essai fermé, dans les conditions définies dans la méthode d'essai, et en quantités telles qu'il en résulte dans le récipient d'essai un mélange vapeur/air inflammable.

Unité: °C

$$t = T - 273,15$$

(t en °C et T en K).

1.3. Substances de référence

Lors de l'examen de nouvelles substances; il n'est pas nécessaire d'utiliser des substances de référence dans tous les cas. Le rôle principal est de servir au calibrage périodique de la méthode et de permettre la comparaison des résultats en cas d'application d'une autre méthode.

1.4. Principe de la méthode

La substance est placée dans un récipient d'essai que l'on chauffe progressivement jusqu'à ce que la concentration de vapeurs dans l'air donne un mélange qui peut être enflammé.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Reproductibilité

La reproductibilité dépend de l'intervalle de point d'éclair et de la méthode d'essai utilisée; maximum ± 2 °C.

1.5.2. Sensibilité

La sensibilité dépend de la méthode d'essai utilisée.

1.5.3. Spécificité

La spécificité de certaines méthodes d'essai est limitée à certains intervalles de point d'éclair et dépend des données relatives à la substance (par exemple haute viscosité).

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparation

Un échantillon de la substance d'essai est placé dans un appareil d'essai conforme aux points 1.6.3.1 et/ou 1.6.3.2.

1.6.2. *Conditions d'essai*

Il est préférable d'installer l'appareil à l'abri des courants d'air.

1.6.3. *Déroulement de l'essai*1.6.3.1. *Méthode de l'équilibre*

Voir normes ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 et ISO 3679.

1.6.3.2. *Méthode du non-équilibre*

Appareil d'Abel:

Voir normes BS 2000, partie 170, NF M07-011 et NF T66-009.

Appareil d'Abel-Pensky:

Voir normes (EN 57), DIN 51755, première partie (pour les températures de 5 °C à 65 °C), DIN 51755, deuxième partie (pour les températures inférieures à 5 °C) et NF M07-036.

Appareil Tag:

Voir normes ASTM D-56 et ISO 2719.

Appareil Pensky-Martens:

Voir normes ISO 2719, (EN 11), DIN 51758, ASTM 8013, ASTM D 93, BS 200-34 et NF M07-019.

Remarques:

Lorsque le point d'éclair déterminé par une méthode basée sur le non-équilibre (voir point 1.6.3.2) a les valeurs suivantes: 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, il importe de la confirmer par une méthode basée sur l'équilibre en utilisant le même appareil.

Seules les méthodes susceptibles de donner la température du point d'éclair peuvent être utilisées pour une notification:

Pour déterminer le point d'éclair des liquides visqueux (peintures, gommés, etc.) contenant des solvants, il ne faut utiliser que des appareils et des méthodes d'essai permettant de déterminer le point d'éclair de liquides visqueux. Voir normes ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 et DIN 53213, partie 1.

2. **DONNÉES**3. **PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**

Le rapport doit comporter, si possible, les informations suivantes:

- description précise de la substance (identification et impuretés),
- description de la méthode utilisée, ainsi que toute variante éventuelle,
- les résultats et toute information ou remarque pouvant être utile dans l'interprétation des résultats.

4. **RÉFÉRENCES**

Aucune.

A. 10. INFLAMMABILITÉ (SOLIDES)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Avant de procéder à cet essai, il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les propriétés explosives potentielles de la substance.

La présente méthode n'est applicable qu'aux substances poudreuses, granuleuses ou pâteuses.

De façon à ne pas englober toutes les substances susceptibles d'être enflammées, mais uniquement celles qui brûlent rapidement ou celles dont la combustion est particulièrement dangereuse d'une façon ou d'une autre, ne sont considérées comme très inflammables que les substances dont la vitesse de combustion dépasse une certaine limite. Par ailleurs, les poudres métalliques susceptibles de se consumer seront également considérées comme très inflammables si l'incandescence se propage dans tout l'échantillon. Cette incandescence et les difficultés liées à l'extinction du feu constituent la raison principale pour laquelle les poudres métalliques sont spécialement dangereuses. Les agents d'extinction habituels, comme le dioxyde de carbone et/ou l'eau, peuvent accroître considérablement les risques.

1.2. Définition et unités

Temps de combustion exprimé en secondes.

1.3. Substances de référence

Non spécifiées.

1.4. Principe de la méthode

La substance sous sa forme commerciale est disposée en tas de 250 millimètres de longueur. On essaie ensuite d'enflammer l'échantillon dans les conditions définies au point 1.6.3 et on mesure le temps de combustion.

1.5. Critères de qualité

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparation

Dans le cas de substances poudreuses ou granuleuses, la substance sous sa forme commerciale est versée en vrac dans un moule métallique de 250 millimètres de longueur et de section transversale triangulaire, dont la hauteur et la largeur intérieure sont respectivement de 10 millimètres et 20 millimètres. De part et d'autre du moule, dans les sens de la longueur, on dispose des plaques métalliques destinées à jouer le rôle de supports latéraux. Ces plaques dépassent de 2 millimètres le bord supérieur de la section triangulaire transversale (voir figure). Ensuite, on laisse tomber trois fois le moule d'une hauteur de 2 centimètres sur une surface dure. Remettre de la substance si nécessaire. Enlever ensuite les plaques latérales et racler le trop-plein. Placer sur le moule une plaque non combustible et non poreuse, retourner l'ensemble, puis démouler.

Étaler les substances pâteuses sur une surface non combustible sous la forme d'un cordon de 250 millimètres de longueur et d'environ 1 centimètre carré de section.

Utiliser une source d'inflammation adéquate, telle qu'une petite flamme ou un fil chauffé à au moins 1 000 °C, pour enflammer le tas à une de ses extrémités.

1.6.2. Conditions d'essai

Dans le cas de substances sensibles à l'humidité, effectuer l'essai le plus vite possible après avoir retiré la substance de son récipient.

1.6.3. Déroulement de l'essai

Enflammer l'une des extrémités du tas. Lorsque le tas a brûlé sur une distance de 80 millimètres, mesurer la vitesse de combustion sur les 100 millimètres suivants. Effectuer l'essai six fois de suite, en utilisant chaque fois une plaque froide et propre.

2. DONNÉES

Pour procéder à l'évaluation, il faut disposer des valeurs de temps de combustion constatées au cours de six essais.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI**3.1. Rapport d'essai**

Le rapport doit contenir, si possible, les informations suivantes :

- la description précise de la substance (identification et impuretés),
- une description de la substance d'essai, son état physique, y compris le taux d'humidité,
- les résultats des mesures,
- toute remarque complémentaire pouvant être utile dans l'interprétation des résultats.

3.2. Interprétation des résultats

Les substances pulvérulantes granuleuses ou pâteuses doivent être considérées comme facilement inflammables lorsque le temps de combustion au cours des six essais effectués conformément au mode opératoire décrit au point 1.6 est inférieur à 45 secondes. Les poudres métalliques ou d'alliages métalliques doivent être considérées comme facilement inflammables lorsqu'elles peuvent être enflammées et que la flamme ou la zone de réaction s'étend à tout l'échantillon.

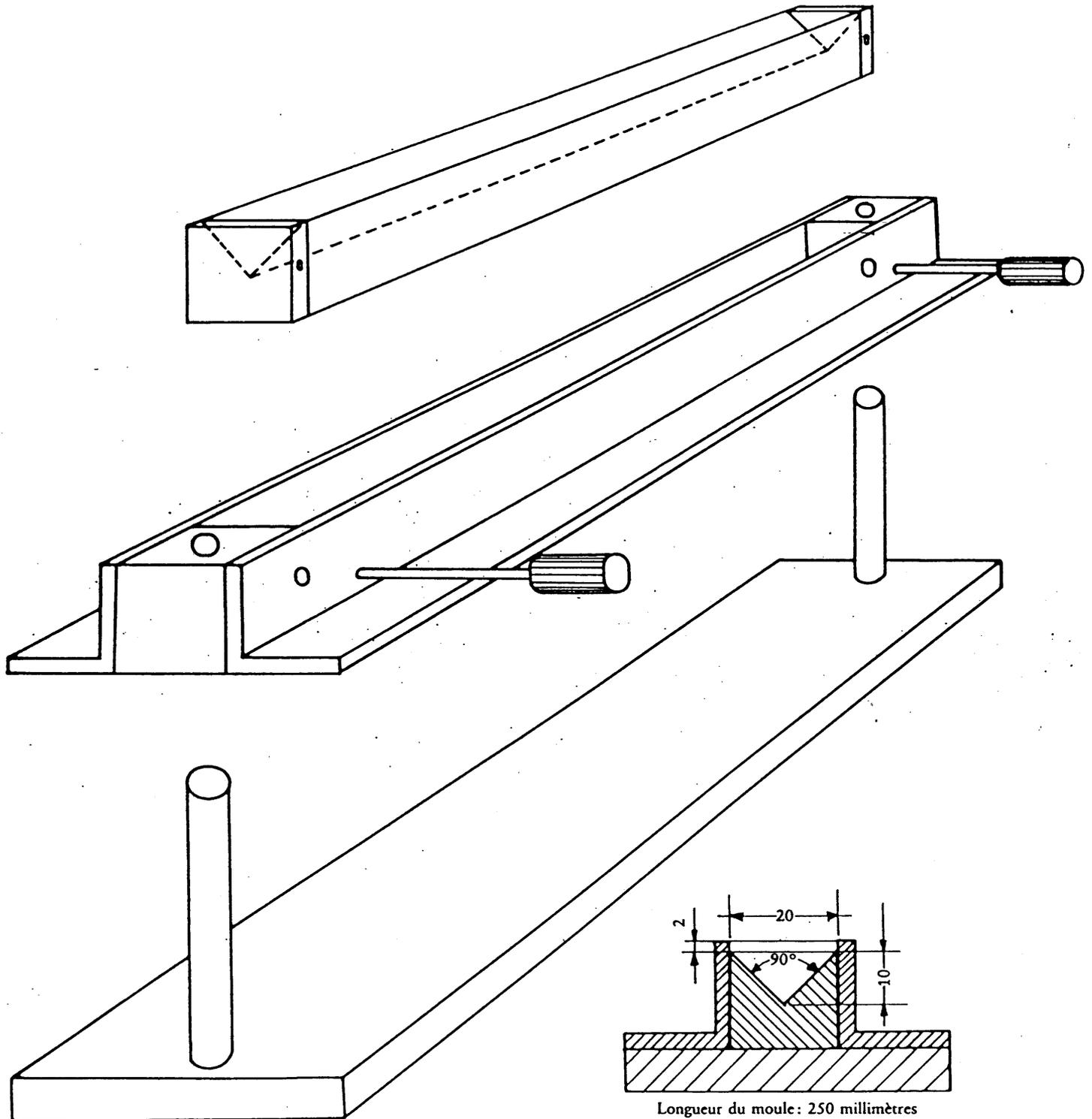
4. RÉFÉRENCES

Aucune

Appendice

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection des tas
(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



Longueur du moule: 250 millimètres
Matériau: aluminium

A. 11. INFLAMMABILITÉ (GAZ)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La présente méthode permet de déterminer si des gaz mélangés à l'air à température et pression ambiantes présentent un intervalle d'inflammabilité. Des mélanges contenant des concentrations croissantes du gaz d'essai sont exposés à une étincelle électrique et on observe si l'inflammation se produit.

1.2. Définition et unités

L'intervalle d'inflammabilité est l'intervalle de concentration entre les limites d'explosion supérieure et inférieure. Les limites d'explosion supérieure et inférieure sont les concentrations dans l'air du gaz inflammable auxquelles le feu ne se propage pas.

1.3. Substance de référence

Non spécifiée.

1.4. Principe de la méthode

La concentration du gaz dans l'air est augmentée graduellement et le mélange est exposé à une étincelle électrique à chaque étape.

1.5. Critères de qualité

Non fixés.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Appareil

Le récipient d'essai est un cylindre en verre d'un diamètre intérieur de 50 millimètres au moins et d'une hauteur de 300 millimètres au moins disposé verticalement. Les électrodes d'inflammation sont distantes l'une de l'autre de 3 à 5 millimètres et placées à 60 millimètres du fond du cylindre. Le cylindre est équipé d'une soupape. L'appareil doit être protégé par un blindage pour limiter les dégâts d'une explosion éventuelle.

La source d'inflammation est une étincelle inductive entretenue d'une durée de 0,5 seconde, produite par un transformateur à haute tension avec une tension de sortie de 10 à 15 kV (la puissance maximale est de 300 W).

1.6.2. Conditions d'essai

L'essai doit avoir lieu à température ambiante.

1.6.3. Déroulement de l'essai

À l'aide de pompes doseuses, le cylindre en verre est rempli d'un mélange air-gaz de concentration connue. Faire jaillir une étincelle au sein de ce mélange et observer si une flamme se détache de la source d'inflammation et se propage de manière indépendante. La concentration de gaz est augmentée de 1 % en volume à la fois jusqu'à ce que l'inflammation décrite ci-avant se produise.

2. DONNÉES

La propagation de la flamme constitue la seule donnée d'information valable pour la détermination de cette propriété.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le rapport doit contenir, si possible, les informations suivantes :

- la description précise de la substance (identification et impuretés),
- une description de l'appareil utilisé, en mentionnant les dimensions,
- la température ambiante lors de l'essai,
- les concentrations d'essai ainsi que les résultats obtenus,
- les résultats de l'essai : gaz ininflammable ou facilement inflammable,
- lorsque l'on conclut à l'ininflammabilité, il importe de déclarer que toutes les concentrations ont été essayées en augmentant les concentrations de 1 % à la fois, de 0 à 100 %,
- toute information ou remarque pouvant être utiles dans l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

Néant.

A. 12. INFLAMMABILITÉ (SUBSTANCES ET PRÉPARATIONS QUI, EN CONTACT AVEC L'EAU OU L'AIR HUMIDE, DÉVELOPPENT DES GAZ FACILEMENT INFLAMMABLES EN QUANTITÉS DANGEREUSES)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Cette méthode d'essai peut être utilisée pour déterminer si la réaction d'une substance avec l'eau entraîne le dégagement d'une quantité dangereuse d'un gaz ou de plusieurs gaz, susceptibles d'être facilement inflammables ou toxiques.

Elle peut être appliquée à la fois aux substances solides et liquides, mais non aux substances qui s'enflamment spontanément au contact de l'air.

1.2. Définitions et unités

Facilement inflammables :

substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent une quantité dangereuse de gaz facilement inflammables, à raison d'un débit minimal de 1 l/kg·h. Cette limite ne tient pas compte de la toxicité du gaz.

1.3. Principe de la méthode

L'essai de la substance comporte plusieurs phases, décrites ci-après; si l'inflammation intervient à une quelconque de ces phases, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai.

1.3.1. Phase 1

Placer la substance d'essai dans un bac contenant de l'eau distillée à 20 °C et noter si le gaz s'enflamme ou non.

1.3.2. Phase 2

Placer la substance d'essai sur un papier filtrant flottant sur de l'eau distillée à 20 °C contenue dans une capsule et noter si le gaz qui se dégage s'enflamme ou non. Le papier-filtre ne sert qu'à maintenir la substance en place, ce qui accroît les probabilités d'inflammation.

1.3.3. Phase 3

Mettre la substance d'essai en tas sur une hauteur de 2 centimètres et un diamètre de 3 centimètres approximativement. Ajouter quelques gouttes d'eau au tas ainsi constitué et noter si le gaz qui se dégage s'enflamme ou non.

1.3.4. Phase 4

Mélanger la substance d'essai avec de l'eau distillée à 20 °C et mesurer le débit du gaz pendant 7 heures, à intervalles d'une heure. Si ce débit est variable ou s'il s'accroît, après 7 heures, le temps de mesure doit être prolongé jusqu'à 5 jours au maximum. L'essai peut être arrêté si le débit excède 1 l/kg·h à un moment donné.

1.4. Substance de référence

Non spécifiée.

1.5. Critères de qualité

Non indiqués.

1.6. Description des méthodes**1.6.1. Phase 1****1.6.1.1. Conditions de l'essai**

La substance d'essai est utilisée sous sa forme commercialisée et l'essai est réalisé à température ambiante (environ 20 °C).

1.6.1.2. Déroulement de l'essai

Placer une petite quantité (approximativement 2 millimètres de diamètre) de la substance d'essai dans un bac contenant de l'eau distillée. Noter si: i) il y a dégagement de gaz, ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il est inutile de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

1.6.2. Phase 2**1.6.2.1. Appareillage**

Papier-filtre flottant sur la surface de l'eau distillée dans un récipient approprié, par exemple une capsule de 100 millimètres de diamètre.

1.6.2.2. Conditions de l'essai

La substance d'essai est utilisée sous sa forme commercialisée et l'essai est réalisé à température ambiante (environ 20 °C).

1.6.2.3. Déroulement de l'essai

Placer une petite quantité de la substance d'essai (approximativement 2 millimètres de diamètre) au centre du papier-filtre. Noter si: i) il y a dégagement de gaz et ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

1.6.3. Phase 3**1.6.3.1. Conditions de l'essai**

La substance d'essai est utilisée sous sa forme commercialisée et l'essai est réalisé à température ambiante (environ 20 °C).

1.6.3.2. Déroulement de l'essai

Mettre la substance d'essai en tas sur une hauteur de 2 centimètres et un diamètre de 3 centimètres approximativement avec au sommet un petit cratère. Ajouter quelques gouttes d'eau dans le creux et noter si: i) il y a dégagement de gaz, ii) le gaz s'enflamme. Si le gaz s'enflamme, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai de la substance, celle-ci étant dès lors considérée comme substance dangereuse.

1.6.4. Phase 4**1.6.4.1. Appareillage**

L'appareillage est indiqué à la figure de l'appendice.

1.6.4.2. Conditions de l'essai

S'assurer que le récipient contenant la substance d'essai est exempt de particules pulvérulentes (< 500 µm). Si celles-ci représentent plus de 1 % en poids du total, ou si l'échantillon est friable, réduire en poudre la substance avant de procéder à l'essai, afin de réduire la dimension des particules pendant le stockage et la manutention; sinon, la substance est utilisée sous sa forme commercialisée. Réaliser l'essai à température ambiante (20 °C) et à pression atmosphérique.

1.6.4.3. Déroulement de l'essai

Verser de l'eau dans l'entonnoir à robinet de l'appareillage, puis prélever, peser et placer dans une fiole conique une quantité suffisante de substance, jusqu'à un poids maximal de 25 grammes, afin d'obtenir un dégagement de gaz compris entre 100 et 250 centimètres cubes. Mesurer par tout moyen approprié le volume de gaz dégagé. Ouvrir le robinet de l'entonnoir afin de laisser pénétrer l'eau dans la fiole conique; déclencher un chronomètre. Noter le temps nécessaire au dégagement total de gaz et, si possible, procéder à des relevés intermédiaires. L'essai doit être réalisé en triple.

Si l'identité chimique du gaz n'est pas connue, celui-ci doit être analysé. Si le gaz contient des constituants facilement inflammables et si l'on ignore si l'ensemble du mélange est facilement inflammable, préparer et essayer un mélange de la même composition conformément à la méthode d'essai (A. 11).

2. DONNÉES

Pour qu'une substance d'essai soit considérée comme une substance dangereuse, une inflammation, ou un dégagement de gaz facilement inflammable à raison d'un débit supérieur à 1 l/kg·h sur trois essais, est suffisante (1.6.1, 1.6.2. et 1.6.3).

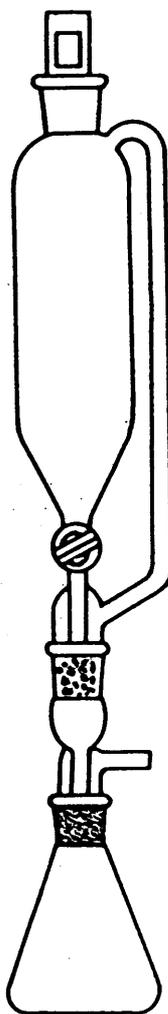
3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le protocole doit contenir, si possible, les données suivantes:

- indication et description précises de la substance telle qu'elle a été reçue (par exemple couleur, dimension des particules et état physique),
- toute préparation initiale de la substance d'essai,
- résultats des essais,
- identité chimique du gaz dégagé,
- débit du gaz dégagé (1.6.4),
- toutes observations complémentaires pertinentes pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

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

*Appendice**Figure***Appareillage**

A. 13. INFLAMMABILITÉ (SOLIDES ET LIQUIDES)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur l'auto-inflammabilité d'une substance. Le procédé d'essai est applicable aux substances solides et liquides commercialisées, sujettes à s'enflammer spontanément en petites quantités peu de temps après être entrées en contact avec l'air à température ambiante.

Les substances non couvertes par cette méthode d'essai sont celles dont l'inflammation spontanée n'intervient qu'après plusieurs heures ou jours à température ambiante, ou celles qui ne s'enflament spontanément qu'après exposition à une température considérablement plus élevée.

1.2. Définitions et unités

Des liquides et des solides sont considérés comme facilement inflammables s'ils s'enflament spontanément au moins une fois sur les six essais pratiqués dans les conditions décrites au point 1.6.

L'auto-inflammabilité des liquides peut également exiger d'être testée selon la méthode citée à la partie A. 15 (auto-inflammabilité: détermination de la température de l'auto-inflammabilité des liquides et gaz volatils).

1.3. Substances de référence

Non spécifiées.

1.4. Principe de la méthode

La substance est mise en contact avec l'air à une température de 25 ± 10 °C pendant 5 minutes. S'il y a inflammation, la substance est considérée comme facilement inflammable.

1.5. Critères de qualité

Répétabilité: en raison de l'importance que revêt l'aspect sécurité, un seul résultat positif sur six essais est suffisant pour conclure que la substance est hautement inflammable.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Appareillage

Remplir une capsule en porcelaine de 10 centimètres de diamètre environ de terre d'infusoires, sur une épaisseur de 5 millimètres environ, à température ambiante.

Remarque:

La terre d'infusoires, ou toute autre substance inerte comparable généralement disponible, sera prise comme représentative du sol sur lequel la substance pourra être accidentellement répandue.

1.6.2. Réalisation de l'essai

a) Solides pulvérulents

Verser 1 ou 2 centimètres cubes de substance pulvérulente à soumettre à l'essai, d'une hauteur d'environ 1 mètre, sur une surface non combustible et observer si la substance s'enflamme pendant la chute ou pendant les cinq premières minutes de tassement.

b) Liquides

Verser environ 5 centimètres cubes du liquide à soumettre à essai dans une capsule de porcelaine préparée et observer si la substance s'enflamme dans les cinq minutes.

2. DONNÉES

Les résultats des six essais sont nécessaires pour l'évaluation.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le protocole doit contenir, si possible, les données suivantes:

- description de la substance à soumettre à essai,
- résultats de l'essai.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, Preliminary Test Guideline for the Determination of Pyrophoric Behaviour of Solids and Liquids. A80/23 — Final report of the OECD chemical testing programme.

A. 14. DANGER D'EXPLOSION

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Il s'agit d'une méthode d'essai permettant de déterminer si une substance ou préparation solide, liquide ou pâteuse présente ou non un danger d'explosion lorsqu'elle est soumise à l'effet d'une flamme (sensibilité thermique), à un choc ou à une friction (sensibilité aux stimulations mécaniques).

La méthode comprend trois parties:

- a) un essai de sensibilité thermique;
- b) un essai de sensibilité mécanique (choc);
- c) un essai de sensibilité mécanique (friction).

La méthode fournit des données permettant d'évaluer la probabilité d'amorcer une explosion par certaines stimulations ordinaires. Elle n'a pas pour objet de déterminer si une substance ou une préparation est ou n'est pas susceptible d'exploser dans certaines conditions, ni de déterminer dans quelle mesure la décomposition initiale peut se propager et causer l'explosion de l'ensemble de l'échantillon.

Elle est apte à déterminer si une substance ou une préparation présente un danger d'explosion (sensibilité thermique et mécanique) dans les conditions particulières définies par la directive. Les essais sont sans objet si les données thermodynamiques disponibles [chaleur de formation, chaleur de décomposition, absence de certains groupes réactifs (1) dans la formule développée] permettent d'établir de façon raisonnablement certaine que la substance ou la préparation n'est pas susceptible de se décomposer, de former des gaz et d'engendrer de la chaleur très rapidement (autrement dit, le matériau ne doit pas présenter de risques d'explosion). Il est cependant admis qu'elle n'a pas une valeur définitive. Elle comporte un certain nombre de types sélectionnés d'appareillages spécifiques, largement utilisés sur le plan international et qui donnent en règle générale des résultats probants.

L'expérimentateur pourra préférer un autre type d'appareillage pour les trois méthodes précitées, à condition que ce choix soit justifié sur le plan scientifique et que cet appareillage soit accepté sur le plan international. Dans ce cas, il doit déterminer la corrélation de ses résultats avec les résultats obtenus à l'aide de l'appareillage spécifié.

1.2. Définitions et unités

Substances et préparations explosibles:

les substances et préparations qui sont susceptibles d'exploser sous l'effet de la flamme, ou qui sont plus sensibles au choc ou à la friction que le dinitrobenzène.

1.3. Substance de référence

Méta-dinitrobenzène, produit technique cristallisé pour la méthode d'essai par friction ou par choc.

1.4. Principe de la méthode

Un test préliminaire de sélection est nécessaire pour déterminer les conditions de sécurité devant présider à l'exécution des trois essais de sensibilité.

1.4.1. *Essai préliminaire de sélection*

Des échantillons très réduits (environ 10 mg) de substance ou de préparation sont soumis: à échauffement sans confinement dans une flamme d'un bec Bunsen, à un choc dans toute forme appropriée d'appareillage et à friction en utilisant un maillet et une enclume, ou tout autre type de dispositif à friction. L'objectif consiste à déterminer si la substance est sensible et explosible au point que les essais de sensibilité prescrits doivent être réalisés en s'entourant de précautions particulières, afin d'éviter tout dommage corporel pour l'expérimentateur.

1.4.2. *Sensibilité thermique*

Cette méthode consiste à chauffer la substance ou la préparation dans un tube d'acier avec différents degrés de confinement assurés par des plaques à trous d'évent de différents diamètres, pour déterminer si la substance ou la préparation est susceptible d'exploser sous contrainte thermique.

1.4.3. *Sensibilité mécanique (choc)*

La méthode consiste à soumettre la substance ou la préparation au choc d'un marteau tombant sur une enclume en acier.

1.4.4. *Sensibilité mécanique (friction)*

Cette méthode consiste à soumettre la substance ou la préparation à une friction entre des surfaces standards, dans des conditions spécifiées de charge et de mouvement relatif.

1.5. Critères de qualité

Non indiqués.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. *Appareillage*

1.6.1.1. *Sensibilité thermique (effet de la flamme)*

Le tube d'acier est réalisé en tôle de qualité emboutissable (voir appendice) par un processus d'étréage. Son diamètre intérieur est de 24 millimètres, sa longueur de 75 millimètres et son épaisseur de paroi de 0,5 millimètre. À son extrémité ouverte, le tube est pourvu d'une bride de fermeture (voir figure 1). Il est pourvu en outre d'une plaque à ajutage circulaire résistante à la pression et comportant un évent. Cette plaque est solidement assujettie au tube par un joint fileté en deux parties (écrou et écrou borgne). La plaque (voir figure 1) a une épaisseur de 6 millimètres et est constituée d'un acier au chrome hautement résistant (voir appendice).

L'expérimentateur dispose d'une série de plaques à ajutage dont l'évent présente différents diamètres (1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ... mm) pour déterminer le degré de risque d'explosion que présente la substance et la préparation. L'écrou et l'écrou borgne (voir figure 1) sont en acier au chrome-manganèse (voir appendice), ne donnant pas lieu à étincelles jusqu'à 800 °C. Les tubes en acier ne sont utilisables que pour une seule expérience.

1.6.1.2. *Sensibilité mécanique (choc)*

L'appareillage classique à mouton comprend essentiellement: un bloc de fonte (fonte grise), une embase et une enclume, une colonne, des guides, une masse tombante et un mécanisme de libération. Le bloc d'acier (longueur 230 mm × largeur 250 mm × hauteur 200 mm), avec une embase coulée (longueur 450 mm × largeur 450 mm × hauteur 60 mm), soutient l'enclume en acier de 100 millimètres de diamètre et 70 millimètres de hauteur, sur lequel elle est vissée. Le support est vissé au dos du bloc et dans ce même support est fixé la colonne qui consiste en un tube d'acier étiré sans soudure de 90 millimètres de diamètre extérieur et de 70 millimètres de diamètre intérieur. Quatre vis ancrées dans un

bloc de béton de 60 × 60 × 60 centimètres maintiennent le mouton de manière que les rails soient absolument verticaux et assurent un guidage facile. Le mouton, pesant 10 kilogrammes, est en acier trempé; il doit avoir une surface d'impact en acier traité HRC 60-63 et un diamètre minimal de 25 millimètres. Pendant les essais, la hauteur de chute est de 0,4 mètre.

L'échantillon soumis à essai est placé dans une matrice consistant en deux cylindres coaxiaux en acier trempé, placés l'un au-dessus de l'autre et en un cylindre d'acier creux faisant office de bague de guidage. Les cylindres coaxiaux doivent avoir un diamètre de 10 (-0,003 - 0,005) millimètres, une hauteur de 10 millimètres également, des surfaces polies et des arêtes arrondies (rayon de courbure 0,5 mm), dureté: HRC 58 à 65. Le cylindre creux aura un diamètre extérieur de 16 millimètres, un alésage de 10 (+ 0,005 + 0,010) millimètres, la face interne polie, et une hauteur de 13 millimètres. Si l'explosion se produit, les cylindres en acier et le cylindre creux ne doivent pas être réutilisés pour d'autres essais. La matrice est placée sur une enclume intermédiaire en acier de 26 millimètres de hauteur et centrée par une bague de centrage avec bague d'arrêt, afin d'éliminer les gaz engendrés par l'explosion.

1.6.1.3. Sensibilité mécanique (friction)

L'appareillage pour l'essai par friction consiste en une plaque de base en fonte (fonte grise), sur laquelle est monté le dispositif de friction proprement dit comprenant un tourillon fixe en porcelaine et plusieurs plateaux de porcelaine mobiles. Le plateau est fixé dans un coulisseau se déplaçant entre deux rails. Le coulisseau est actionné par une barre d'entraînement, une poulie excentrique et un engrenage de transmission, avec moteur électrique, de telle sorte que le plateau se déplace sur une distance de 10 millimètres, en arrière et en avant sous la barre d'entraînement. Le tourillon est chargé à 360 newtons.

Les plateaux de porcelaine sont en porcelaine technique blanche et ont les dimensions suivantes: 25 millimètres de longueur × 25 millimètres de largeur × 5 millimètres d'épaisseur. Les deux faces de friction des plateaux sont rendues plus rugueuses (profondeur brute: 9 à 32 µm) avant chauffage, en frottant à l'aide d'une éponge.

Le tourillon cylindrique est également en porcelaine blanche technique: longueur 15 millimètres, diamètre 10 millimètres, faces à extrémités sphériques, rugueuses (rayon de courbure 10 mm).

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Sensibilité thermique (effet de la flamme)

Placer la substance, sous la forme physique dans laquelle elle est fournie, dans le tube jusqu'à une hauteur de 60 millimètres, en trois fois par quantité égale. Tasser légèrement à chaque fois en appliquant une force de 80 newtons sur la surface à l'aide d'un piston en bois approprié, d'un diamètre légèrement inférieur à celui du tube. Si la substance est gélatineuse, éviter la formation de bulles d'air pendant le remplissage.

1.6.2.2. Sensibilité mécanique (choc)

Tester la substance à l'état sec. L'échantillon doit avoir un volume de 40 millimètres cubés, ou compatible avec l'appareillage indiqué. En ce qui concerne les substances solides, à l'exception des substances pâteuses, procéder comme suit:

- tamiser les substances pulvérulentes (maille de 0,5 mm); la fraction séparée par tamisage est utilisée pour essai;
- désagréger et tamiser les substances comprimées, coulées ou condensées; la fraction séparée par tamisage (diamètre de 0,5 à 1 mm) est utilisée pour l'essai.

Pour ce qui est des substances liquides, pousser vers le bas le cylindre métallique supérieur jusqu'à 1 millimètre du cylindre inférieur et le maintenir dans cette position.

1.6.2.3. Sensibilité mécanique (friction)

Tester la substance à l'état sec. L'échantillon doit avoir un volume de 10 millimètres cubes. Pour les substances solides, à l'exception des substances pâteuses, procéder comme suit :

- a) tamiser les substances pulvérulentes (maille de 0,5 mm) ; la fraction séparée par tamisage est utilisée pour l'essai ;
- b) désagréger et tamiser les substances comprimées, coulées ou condensées ; la fraction séparée par tamisage (diamètre inférieur à 0,5 mm) est utilisée pour l'essai.

1.6.3. Déroulement des essais

1.6.3.1. Sensibilité thermique (effet de la flamme)

Le chauffage est assuré par du propane venant d'une bouteille de gaz comprimé industriel, équipée d'un régulateur de pression (500 mbar), d'un débitmètre et distribué par un collecteur aux quatre brûleurs. Les quatre brûleurs consomment 3,2 litres de propane par minute. Si d'autres gaz de chauffage sont utilisés, on choisira brûleurs, consommation de gaz, entrée d'air de façon que des mesures comparatives effectuées avec des substances inertes (sable, phtalate de dibutyle) montrent dans les tubes remplis des montées en température similaires à celles obtenues avec le propane.

Les brûleurs sont situés autour de la chambre d'essai, comme indiqué à la figure 2.

Ajuster les brûleurs de telle sorte que la pointe du cône bleu interne de la flamme touche presque le tube. L'essai sera effectué dans une chambre métallique dont les dimensions sont indiquées à la figure 2.

Les dimensions des brûleurs à propane sont indiquées dans les figures 3a et 3b.

Deux séries de trois essais sont obligatoires, la première série utilisant une plaque à ajutage avec un orifice de 2 millimètres de diamètre, la seconde, un orifice d'un diamètre supérieur à 2 millimètres (par exemple 6 mm).

Si l'explosion se produit au cours de la première série (orifice 2 mm), il n'est pas nécessaire de procéder aux séries d'essai suivantes. Si l'explosion ne se produit pas après 5 minutes, l'essai est terminé.

1.6.3.2. Sensibilité mécanique (choc)

Six essais seront réalisés avec l'appareil d'essai par choc indiqué, la masse de 10 kilogrammes tombant de 0,4 mètre. Dans d'autres appareils, l'échantillon est comparé avec du m-dinitrobenzène, selon la procédure établie (technique « up-and-down », etc.).

1.6.3.3. Sensibilité mécanique (frottement)

Placer le tourillon en porcelaine sur l'échantillon soumis à essai et accrocher le poids. Lors de la réalisation de l'essai, les marques laissées par l'éponge sur le plateau de porcelaine doivent être transversales par rapport à la direction du mouvement. Veiller à ce que le tourillon repose sur l'échantillon, à ce que la quantité de substance testée soit suffisante et à ce que le plateau se déplace correctement sous le tourillon, c'est-à-dire qu'il accomplisse un mouvement de va-et-vient sur une distance de 10 millimètres dans chaque direction, et ce en 0,44 seconde. N'utiliser chaque partie de la surface que pour un seul essai.

2. DONNÉES

2.1. Interprétation des résultats

Les essais peuvent être interrompus dès qu'un résultat positif est obtenu lors de l'un des tests.

2.2. Évaluation

En principe, une substance ou une préparation est considérée comme présentant un risque d'explosion dans le sens de la directive si :

- a) une explosion se produit (c'est-à-dire si le tube éclate en trois ou plusieurs morceaux) dans le nombre fixé d'essais de sensibilité thermique,
ou si
- b) une explosion (l'inflammation équivaut à une explosion) se produit au moins une fois au cours de six essais réalisés à l'aide de l'appareil d'essai par choc indiqué, ou si l'échantillon est plus sensible que le m-dinitrobenzène lors d'un autre test par choc,
ou si
- c) une explosion (la déflagration ou l'inflammation équivaut à une explosion) se produit au moins une fois au cours de six essais réalisés à l'aide de l'appareil d'essai par friction indiqué, ou si l'échantillon est plus sensible que le 1,3-dinitrobenzène lors d'un autre test par friction.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

3.1. Protocole de l'essai

Le protocole doit contenir, si possible, les données suivantes :

- identité, composition, pureté, degré hygrométrique, etc., de la substance ou de la préparation soumise à essai,
- forme physique de l'échantillon; préciser s'il a été tamisé ou non,
- observations durant les essais (type de réaction, étincelles, flamme, explosion, nombre de fragments, etc.),
- résultats de chaque essai,
- si un autre appareil a été utilisé, consigner les justifications scientifiques de cette utilisation ainsi que les preuves de la corrélation entre les résultats obtenus à l'aide de l'appareil équivalent,
- toutes observations utiles, notamment référence aux essais pratiqués sur des produits similaires, susceptibles d'être pertinentes pour une interprétation correcte des résultats.

3.2. Interprétation et évaluation des résultats

Le protocole doit faire état des résultats considérés comme erronés, anormaux ou non représentatifs. Lorsqu'un des résultats est rejeté, fournir une explication et indiquer les résultats de tout essai substitutif ou supplémentaire.

Parfois le résultat peut être faussé en raison de la forme physique ou de la nature volatile de la substance ou de la préparation durant l'essai; dans ce cas, il est utile de connaître le résultat que l'on obtiendrait si la substance ou la préparation était utilisée sous sa forme commercialisée. Des essais différents pourront permettre d'obtenir cette donnée. À moins de pouvoir expliquer de cette façon un résultat anormal, celui-ci doit être accepté tel quel et utilisé pour classer la substance ou la préparation en conséquence.

4.

RÉFÉRENCES

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

*Appendice***Exemple de spécification du matériau**

- (1) Spécification n° 1.0336.505 g, conformément à DIN 1623, feuille 1.
 - (2) Spécification n° 1.4873, conformément à la feuille «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490-52.
 - (3) Spécification n° 1.3817, conformément à la feuille «Stahl-Eisen-Werkstoff» 490-52.
-

Figure 1

(dimensions en millimètres)

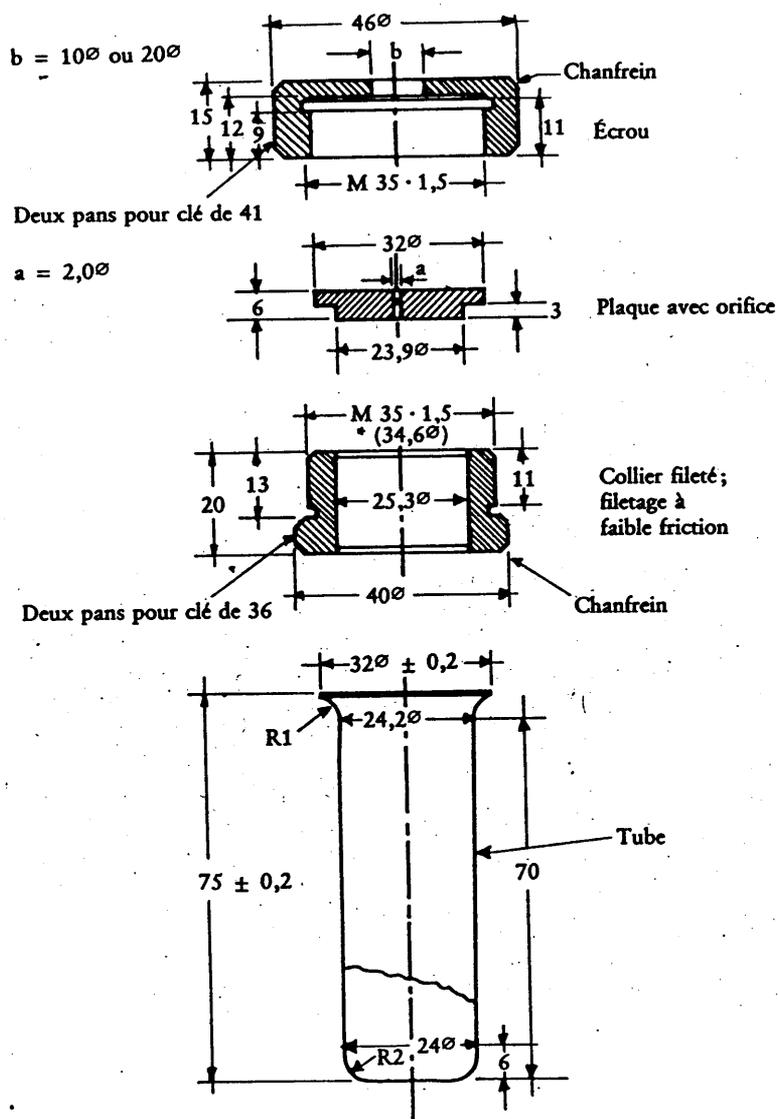


Figure 2

(dimensions en millimètres)

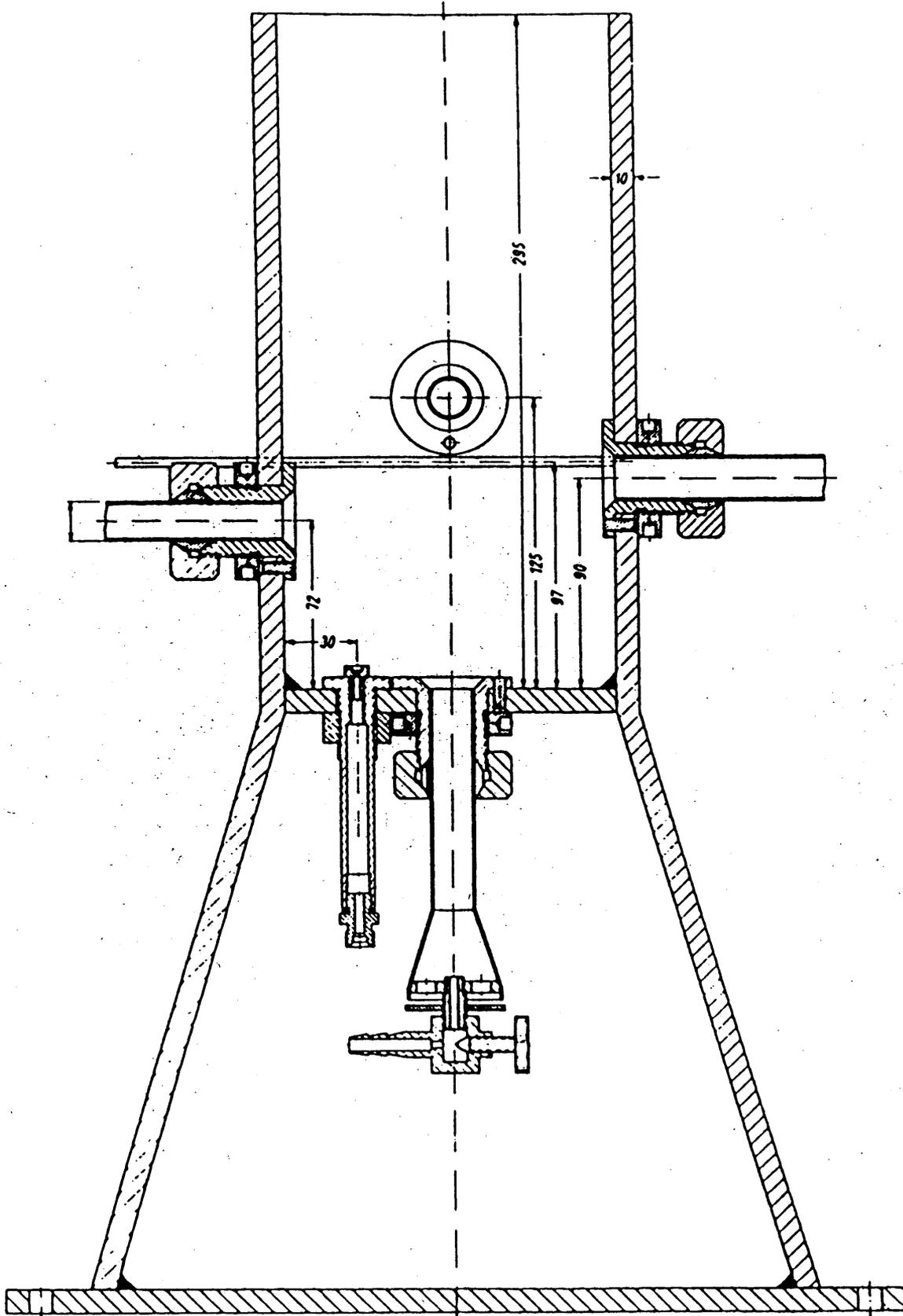


Figure 3a

Matière: laiton

(dimensions en millimètres)

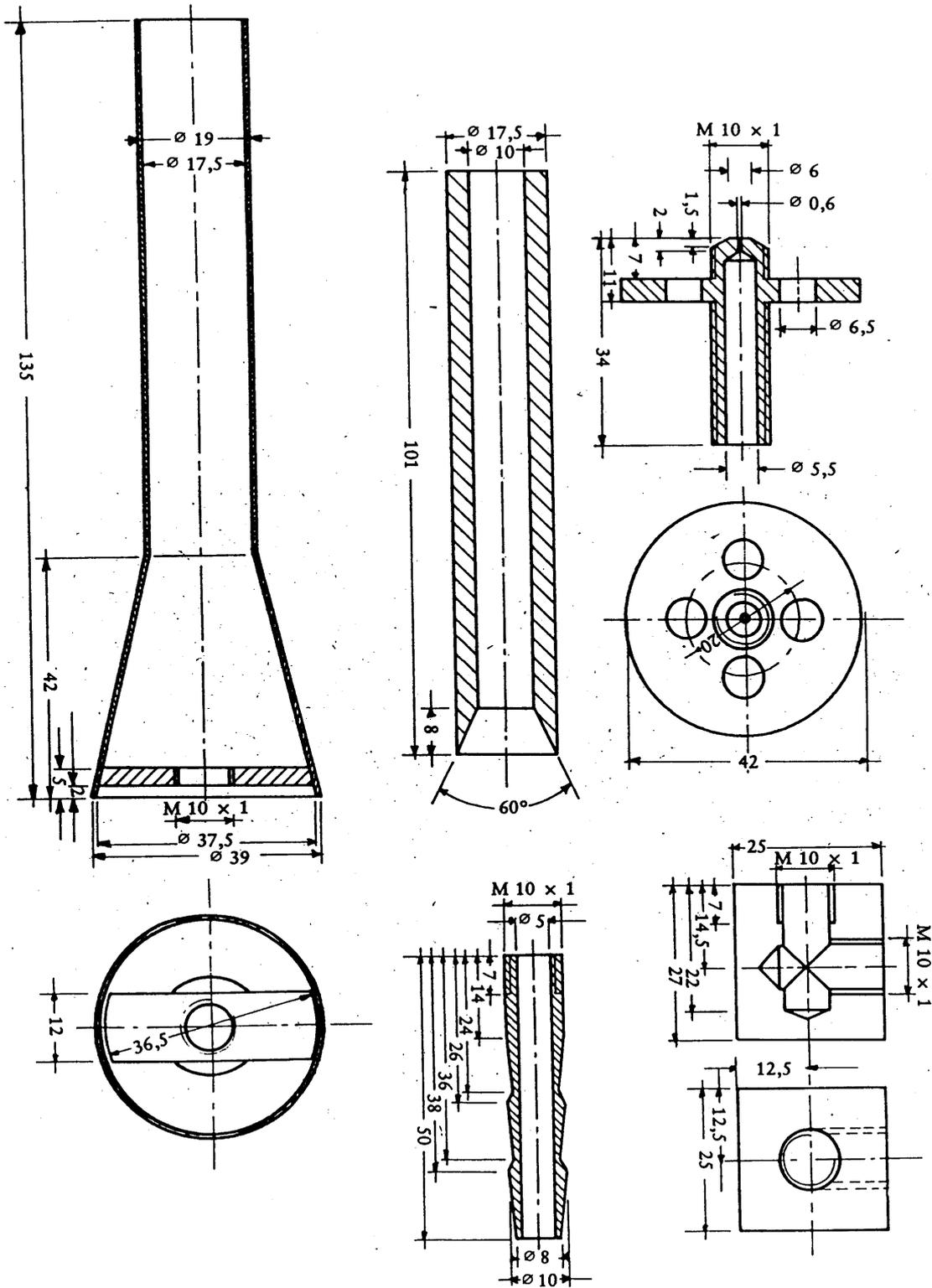
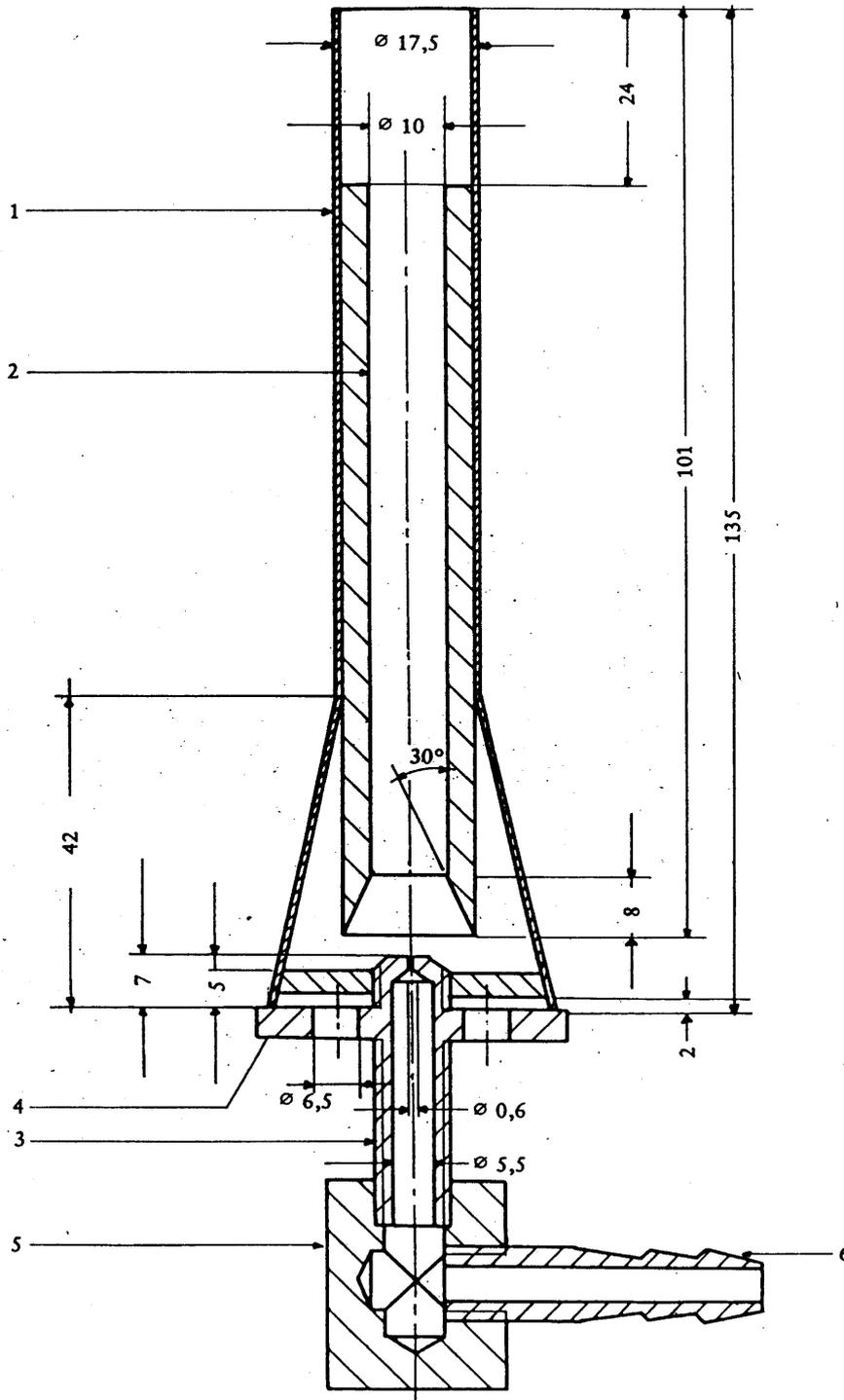


Figure 3b

Matière: laiton

(dimensions en millimètres)



A. 15. AUTO-INFLAMMABILITÉ (DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE D'AUTO-INFLAMMABILITÉ DES LIQUIDES VOLATILS ET DES GAZ)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur l'auto-inflammabilité d'une substance. Le mode opératoire décrit ici est applicable aux substances gazeuses et liquides volatils et à leurs vapeurs, qui, sous leurs formes commerciales, peuvent être enflammées par une surface chaude en présence d'air. La température d'auto-inflammation peut être réduite considérablement par la présence d'impuretés catalytiques.

1.2. Définitions et unités

Le degré d'auto-inflammabilité est exprimé en termes de température d'auto-allumage. La température d'auto-allumage est la température la plus basse à laquelle s'enflamme la substance d'essai en mélange avec de l'air dans les conditions définies dans la méthode d'essai.

1.3. Substances de référence

Pas spécifiées.

1.4. Principe de la méthode

L'auto-inflammabilité des gaz et vapeurs est déterminée au moyen de l'appareil décrit dans la norme CEI 79-4.

1.5. Critères de qualité

La reproductibilité est fonction de l'intervalle de température d'auto-allumage et de la méthode d'essai utilisée: maximum ± 5 °C.

La sensibilité dépend de la méthode d'essai utilisée.

La spécificité dépend également de la méthode d'essai utilisée.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Appareil

L'appareil est décrit dans la méthode évoquée au point 1.6.3.

1.6.2. Conditions de l'essai

Un échantillon de la substance d'essai est testé selon le point 1.6.3.

1.6.3. Déroulement de l'essai

Voir normes CEI 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78 et BS 4056.

2. DONNÉES

Noter la température d'essai, la pression atmosphérique, la quantité d'échantillon utilisée, l'intervalle de temps qui s'écoule avant que l'inflammation se produise.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le rapport doit comporter, si possible, les informations suivantes:

- l'indication précise de la substance (identification et impuretés),
- quantité d'échantillon utilisée, pression atmosphérique,
- résultats des mesures (températures d'essai, résultats en ce qui concerne l'inflammation, les intervalles de temps correspondants),
- toute remarque complémentaire utile pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

Néant.

A. 16. AUTO-INFLAMMABILITÉ (SOLIDES — DÉTERMINATION DE LA TEMPÉRATURE RELATIVE D'INFLAMMATION SPONTANÉE)

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Les substances explosibles et les substances qui s'enflamment au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai.

L'objectif en est de fournir des données préliminaires sur l'inflammabilité spontanée des substances solides aux hautes températures.

Si la chaleur engendrée, soit par une réaction de la substance avec l'oxygène, soit par décomposition exothermique ne se dissipe pas assez rapidement dans l'environnement, l'auto-échauffement entraîne l'inflammation spontanée. L'inflammation spontanée se produit par conséquent lorsque la vitesse de génération excède la vitesse de dissipation de la chaleur.

Le procédé d'essai est utile en tant que test préliminaire de sélection des substances solides. Compte tenu de la nature complexe de l'inflammation et de la combustion des solides, la température d'inflammation spontanée déterminée selon cette méthode d'essai ne doit servir qu'à des fins de comparaison.

1.2. Définition et unités

La température d'inflammation spontanée telle qu'elle est déterminée par cette méthode est la température ambiante minimale exprimée en degrés Celsius (°C), à laquelle un certain volume d'une substance s'enflamme spontanément dans des conditions définies.

1.3. Substance de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

Placer un volume défini de la substance soumise à essai dans un four à température ambiante; enregistrer la courbe température-temps au centre de l'échantillon, la température du four étant portée à 400 °C à la vitesse de 0,5 °C par minute. La température du four à laquelle la température de l'échantillon atteint 400 °C par auto-échauffement est dénommée température d'inflammation spontanée aux fins du présent essai.

1.5. Critères de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Appareillage

1.6.1.1. Four

Un four de laboratoire à température programmée (volume: environ 2 litres) équipé d'une circulation d'air naturelle et d'un clapet d'explosion. Il s'agit de veiller à ce que les gaz de décomposition ne puissent pas entrer en contact avec les résistances électriques afin d'éviter tout risque d'explosion.

1.6.1.2. Cube en treillis de fil métallique

Couper, suivant le modèle indiqué à la figure 1 (voir appendice), un morceau de treillis en fil d'acier inoxydable d'une largeur de maille de 0,045 millimètre. Plier le treillis et l'assujettir, avec du fil métallique, en forme de cube ouvert, c'est-à-dire sans face supérieure.

1.6.1.3. Thermocouples

Thermocouples appropriés.

1.6.1.4. Enregistreur

Tout enregistreur à deux canaux, étalonné à l'intervalle 0 – 600 °C ou à une tension correspondante.

1.6.2. Conditions de l'essai

L'essai portera sur des substances se présentant sous leur forme commercialisée.

1.6.3. Déroulement de l'essai

Remplir le cube de substance soumise à essai. Tasser doucement et ajouter de la substance jusqu'à remplir complètement le cube. Suspendre l'échantillon au centre du four à température ambiante. Placer un thermocouple au centre du cube et l'autre entre le cube et la paroi du four afin d'enregistrer la température de ce dernier.

Les températures du four et de l'échantillon sont enregistrées en continu, la température du four étant portée à 400 °C, ou au point de fusion du solide, si cette valeur est moindre, à une vitesse de 0,5 °C par minute.

Lorsque la substance s'enflamme, le thermocouple de l'échantillon indiquera une très forte montée de température par rapport à la température du four.

2. DONNÉES

Le température du four à laquelle la température de l'échantillon atteint 400 °C par auto-échauffement est pertinente pour l'évaluation (voir figure 2 à l'appendice).

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le protocole de l'essai doit comprendre les données suivantes:

- description de la substance soumise à essai,
- résultats des mesures, y compris la courbe de température-temps,
- toutes remarques complémentaires, pertinentes pour l'interprétation des résultats.

4. RÉFÉRENCES

Néant.

Appendice

Figure 1

Modèle de cube d'essai de 20 millimètres

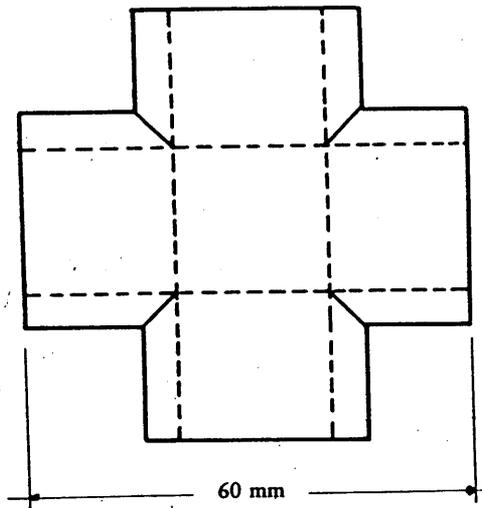
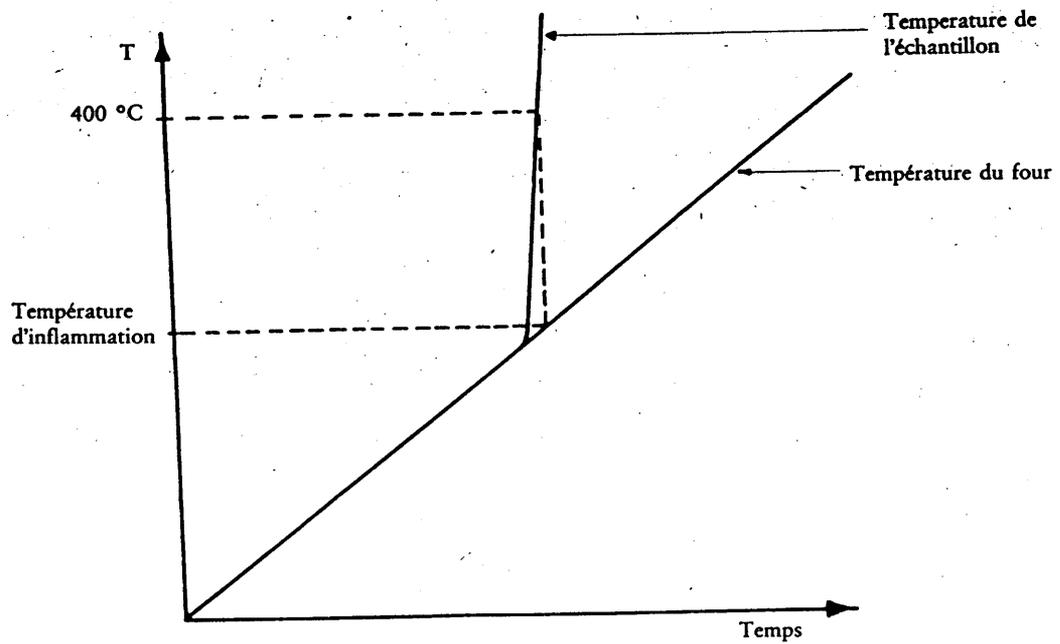


Figure 2

Courbe type température/temps



A. 17. PROPRIÉTÉS COMBURANTES

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Il est utile d'avoir des informations préliminaires sur les propriétés comburantes et la toxicité éventuelle de la substance avant d'effectuer cet essai.

Cet essai n'est pas applicable aux liquides, aux gaz, aux substances explosives ou facilement inflammables, aux peroxydes organiques et aux substances solides qui peuvent fondre dans les conditions de l'essai.

Cet essai est inadapté quand l'examen de la structure chimique montre que sans aucun doute la substance ou préparation ne peut avoir une réaction exothermique avec un combustible.

Pour s'assurer que cet essai ne nécessite pas de précautions particulières, un essai préliminaire doit être effectué.

1.2. Définitions et unités

Temps de combustion: temps de réaction, exprimé en secondes, pris par la zone de réaction pour se propager à travers le tas, selon la procédure décrite au point 1.6.

Vitesse de combustion: exprimée en millimètres par seconde

Vitesse maximale de combustion: valeur la plus élevée parmi les vitesses de combustion obtenues avec des mélanges contenant de 10 à 90 % en poids de comburant.

1.3. Substances de référence

Le nitrate de barium (de pureté analytique) est utilisé comme substance de référence pour l'essai et l'essai préliminaire.

Le dichromate de potassium peut aussi être utilisé lors de l'essai préliminaire.

Des précautions spéciales doivent être prises lors de la manutention du dichromate de potassium.

Le mélange de référence est composé de nitrate de barium et de cellulose en poudre, préparé conformément au point 1.6 et possédant la vitesse de combustion maximale (il s'agit généralement d'un mélange contenant 60 % de nitrate de barium en poids).

1.4. Principe de la méthode

Pour des raisons de sécurité, un essai préliminaire est fait. Il est inutile de continuer l'essai si l'essai préliminaire montre que la substance a des propriétés oxydantes. Lorsque ce n'est pas le cas, la substance ou la préparation est soumise à l'essai complet.

Dans cet essai, la substance d'essai et un combustible défini sont mélangés dans des proportions variables. Chacun de ces mélanges est alors disposé en tas que l'on enflamme à une extrémité. La vitesse maximale de combustion est comparée à la vitesse maximale de combustion du mélange de référence.

1.5. Critères de qualité

Lorsqu'elle est requise, toute méthode de broyage et de mélange est valable pour autant que l'écart entre la vitesse maximale de combustion et la moyenne arithmétique, dans les six essais, ne dépasse pas 10 %.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. *Essai préliminaire*

La substance, telle que commercialisée, est séchée. La substance séchée est grossièrement mélangée à de la cellulose ou à de la sciure séchée dans des proportions en poids 2-1 et le mélange ainsi formé est mis en petit tas conique de 3,5 centimètres de diamètre de base et de 2,5 centimètres de hauteur par remplissage sans tassement d'une forme conique appropriée (par exemple, un entonnoir de laboratoire en verre dont le tube est bouché).

Le tas est mis sur une surface froide, non absorbante et non conductrice. La source d'ignition est un fil métallique inerte, platine ou nickel (qui peut être chauffé approximativement à 1 000 °C), placé à plus ou moins 1 millimètre au-dessus de la surface d'essai et traversant la base du petit tas conique. L'essai doit être conduit dans une hotte aspirante (voir point 1.6.3).

La source d'ignition reste allumée pendant le test. L'intensité et la durée de la réaction sont observées et notées.

La substance ou préparation doit être considérée comme oxydante si la réaction est intense.

Lorsqu'il y a doute quant au résultat, il est nécessaire de pratiquer l'essai complet décrit ci-après.

1.6.2. *Préparations*

1.6.2.1. Substance d'essai

L'échantillon est traité comme suit afin d'obtenir une granulométrie inférieure à 0,125 millimètre: la substance telle que commercialisée est tamisée. Broyer la fraction restante, répéter cette opération jusqu'à ce que tout l'échantillon soit passé au travers du tamis.

Toutes méthodes de broyage et de tamisage respectant les critères de qualité requis peuvent être utilisées.

La substance est séchée à 105 °C jusqu'à poids constant avant de faire le mélange. Si la température de décomposition de la substance est inférieure à 105 °C, la substance sera séchée à une température moins élevée.

1.6.2.2. Combustible

Le combustible est de la cellulose en poudre et du type utilisé en chromatographie en couche mince ou en colonne. Une cellulose dont la longueur de plus de 85 % des fibres est comprise entre 0,020 millimètre et 0,075 millimètre s'avère adéquate. La poudre de cellulose est tamisée au moyen d'un tamis à mailles de 0,125 millimètre.

Avant de préparer le mélange, sécher la cellulose à 105 °C jusqu'à poids constant.

Si la sciure de bois est utilisée lors de l'essai préliminaire, on emploie une sciure de bois tendre passant à travers un tamis de 1 600 micromètres, que l'on mélange et puis sèche à 105 °C pendant quatre heures, en couches de moins de 25 millimètres. La sciure est refroidie et conservée dans un emballage étanche rempli aussi complètement que possible. L'utilisation se fera préférentiellement dans les 24 heures après séchage.

1.6.2.3. Mélanges

Préparer des mélanges de comburant et de cellulose contenant de 10 à 90 % de comburant par incréments de 10 %. Pour les cas limites, utiliser des mélanges intermédiaires pour déterminer la vitesse maximale de combustion avec plus de précision.

Note:

Les mélanges de comburant et de cellulose présentant un risque d'explosion doivent être manipulés avec prudence.

On réalise le tas au moyen d'un moule métallique de section triangulaire de 250 millimètres de longueur, avec une hauteur intérieure de 10 millimètres et une largeur intérieure de 20 millimètres. Placer autour de ce moule un cadre métallique dépassant de 2 millimètres le bord supérieur de la section triangulaire (voir figure à l'appendice). Remplir sans tasser le moule avec un excès de mélange. Après avoir laissé tomber une fois le moule d'une hauteur de 2 centimètres sur une surface dure, éliminer la matière excédentaire au moyen d'une raclette tenue obliquement. Enlever alors le cadre métallique et égaliser la surface de la poudre au moyen d'un rouleau. Disposer une plaque non combustible sur le moule, retourner et démouler.

1.6.2.4. Source d'ignition

Utiliser la flamme d'un brûleur à gaz ou un fil de platine chauffé électriquement à 1 000 °C.

1.6.3. Conditions de l'essai

Disposer le tas dans une hotte perpendiculairement au sens du courant d'air.

La vitesse d'aspiration ne doit pas varier pendant les essais, elle doit être suffisante afin d'éviter que les fumées ne s'échappent dans le laboratoire. Un coupe-vent est disposé devant l'appareil.

Vu les propriétés hygroscopiques de la cellulose et des substances à tester, l'essai doit être entrepris aussi rapidement que possible.

Appliquer la flamme ou le fil de platine incandescent à une extrémité du tas. Mesurer le temps de réaction sur 200 millimètres après que la zone de réaction ait parcouru une distance de 30 millimètres.

L'essai est effectué avec la substance de référence. L'essai est ensuite effectué au moins une fois avec chacun des mélanges de la substance à tester avec la cellulose. Si l'on trouve une vitesse maximale de réaction significativement plus grande que celle de la substance de référence, l'essai peut être arrêté; autrement, avec les trois mélanges ayant donné les trois vitesses de réaction les plus élevées, les essais doivent être répétés cinq fois.

2. DONNÉES

Pour des raisons de sécurité, la vitesse maximale de réaction, et non la moyenne des vitesses, sera retenue pour caractériser les propriétés comburantes de la substance examinée.

Pour l'évaluation d'un mélange donné, retenir la vitesse de combustion la plus élevée mesurée au cours des six essais.

Porter sur un graphique la vitesse de combustion la plus élevée de chaque mélange en fonction de la teneur en comburant.

En déduire la vitesse maximale de combustion.

Les six vitesses de combustion mesurées pour le mélange qui a donné la vitesse maximale de combustion ne doivent pas s'écarter de plus de 10 % de la moyenne arithmétique. Dans le cas contraire, il importe d'améliorer les méthodes de broyage et de mélange.

Comparer la vitesse maximale de combustion obtenue avec la vitesse maximale de combustion du mélange de référence (voir point 1.3).

3. RAPPORT**3.1. Rapport de l'essai**

Le rapport contiendra si possible les éléments suivants:

- description de la substance à examiner,
- tout traitement de l'échantillon (par exemple: broyage, séchage),
- les résultats des mesures,
- le type de réaction (par exemple: combustion rapide superficielle, combustion à travers toute masse, toute observation concernant les produits de combustion, etc.),
- toutes autres remarques utiles à l'interprétation des résultats, y compris une description de l'intensité (flamme, étincelle, fumée, lente incandescence, etc.) et de la durée approximative de la réaction observée au cours du test préliminaire pour la substance et la substance de référence.

3.2. Interprétation des résultats

Une substance est à considérer comme comburante si:

- a) lors de l'essai préliminaire, il y a réaction intense;
- b) lors de l'essai, la vitesse maximale de combustion est supérieure ou égale à celle du mélange de référence cellulose et nitrate de barium.

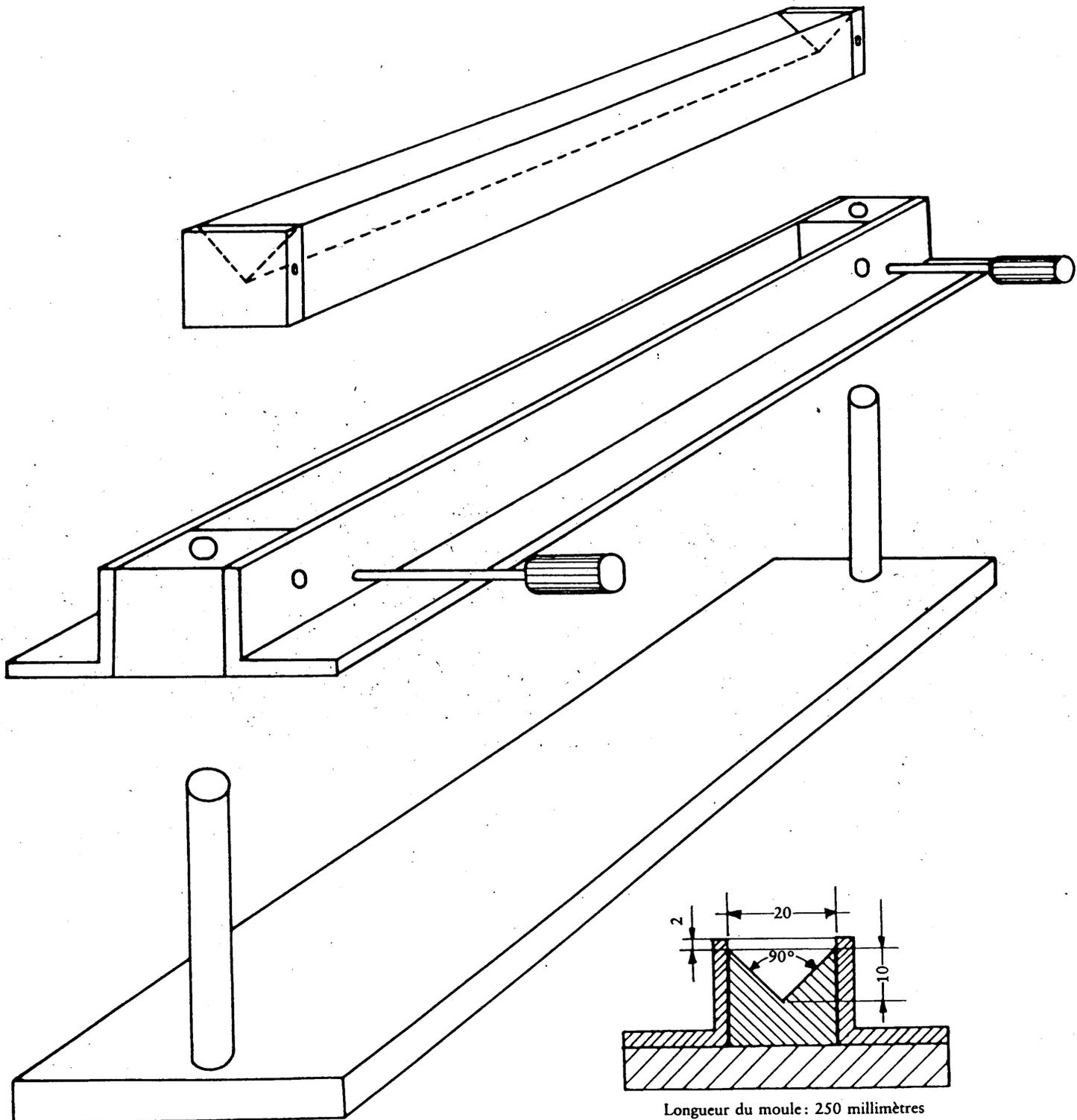
4. RÉFÉRENCES

Néant.

Appendice

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection des tas
(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



Longueur du moule: 250 millimètres
Matériau: aluminium

PARTIE B: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ

INTRODUCTION GÉNÉRALE, PARTIE B

A. INTRODUCTION

Voir l'introduction générale.

B. DÉFINITIONS

- i) La *toxicité aiguë* inclut les effets défavorables qui se manifestent pendant une période imposée (habituellement 14 jours) après l'administration d'une dose unique de substance.
- ii) La DL_{50} (dose mortelle médiane) est la dose unique qui est, statistiquement, responsable de la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée. La valeur de la DL_{50} est exprimée en poids de substance testée par rapport à l'unité de poids des animaux soumis à l'expérimentation (milligramme par kilo).
- iii) La CL_{50} (concentration mortelle médiane) est la concentration d'une substance qui est, statistiquement, responsable, au cours d'une exposition ou dans un délai défini après celle-ci, de la mort de 50 % des animaux exposés pendant une durée déterminée. La valeur de la CL_{50} est exprimée en poids de substance testée rapportée à un volume standard d'air (milligramme par litre).
- iv) Le *niveau dépourvu d'effets toxiques* est représenté par la dose ou le niveau d'exposition maximal qui ne produit pas d'effet défavorable détectable lors de l'expérimentation.
- v) La *toxicité subaiguë/subchronique* inclue les effets défavorables qui apparaissent chez les animaux d'expérience lorsqu'ils reçoivent des administrations quotidiennes d'une substance ou lorsqu'ils sont exposés journalièrement pendant une période brève en regard de leur vie prévue.
- vi) La *dose maximale tolérable (DMT)* est le niveau d'intoxication le plus élevé qui produit dans l'expérimentation où il est utilisé des signes de toxicité sans altérer de façon majeure la survie des animaux, par exemple, lors d'une étude de carcinogénicité, des effets autres que l'apparition de tumeurs.
- vii) L'*irritation cutanée* consiste en la production de modifications cutanées réversibles de nature inflammatoire qui apparaissent après application d'une substance.
- viii) L'*irritation des yeux* est la production de modifications oculaires réversibles qui apparaissent après application de la substance sur la surface antérieure de l'œil.
- ix) La *sensibilisation de la peau* (dermites de contact allergique) est une réaction cutanée d'origine immunologique à une substance.

C. ÉVALUATION ET INTERPRÉTATION

Il y a des limites à extrapoler directement à l'homme les résultats obtenus par l'expérimentation animale et ceux obtenus *in vitro*; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais de toxicité.

Lorsqu'elles sont disponibles, les données concernant l'homme sont considérées comme plus pertinentes pour la détermination des effets potentiels des substances chimiques sur la population humaine.

MUTAGÉNICITÉ (y compris essais de dépistage de la carcinogénicité)

L'évaluation préliminaire du potentiel mutagène d'une substance nécessite l'obtention d'informations concernant deux mécanismes, à savoir, la mutation génique et les aberrations chromosomiques.

Ces deux mécanismes sont étudiés au moyen des tests suivants:

- i) des tests basés sur l'apparition de mutations géniques (ponctuelles) chez des cellules procaryotes telles que le *Salmonella typhimurium*; on peut également utiliser l'*Escherichia coli*. Le choix entre ces deux organismes peut être déterminé par la nature de la substance à tester;

- ii) des tests basés sur la production d'aberrations chromosomiques chez des cellules de mammifères cultivées *in vitro*; on peut également opérer *in vivo* (le test du micronoyau ou l'analyse des cellules de la moelle osseuse au stade de la métaphase).

D. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

La toxicologie est une science expérimentale en plein essor et il existe une littérature abondante pour chaque sujet. Des renseignements utiles figurent dans les lignes directrices correspondantes de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

Remarques complémentaires

Soins à apporter aux animaux

Dans le cas des expérimentations toxicologiques, il est essentiel de procéder à des contrôles rigoureux des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques de soins appropriées concernant les animaux.

i) Conditions d'hébergement

Les conditions ambiantes des locaux ou enceintes où ont lieu les expérimentations doivent être appropriées à la nature de l'espèce utilisée. Pour les rongeurs, la température du local doit être de 22 °C (\pm 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins et les cobayes, la température doit être de 20 °C (\pm 3 °C) et l'humidité relative de 30 à 70 %.

Certaines techniques expérimentales sont particulièrement sensibles aux effets de la température et, dans ces cas, des indications détaillées concernant les conditions appropriées sont incluses dans la description de la méthode. Dans toutes les recherches sur les effets toxiques, la température et l'humidité doivent être surveillées, enregistrées et les mesures consignées dans le rapport final d'étude.

Lorsqu'on utilise un éclairage artificiel, il faut normalement alterner 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les données relatives au programme d'éclairage doivent être enregistrées et consignées dans le rapport final d'étude.

Dans les rapports concernant les expériences sur des animaux, il est important d'indiquer le type de cage utilisé ainsi que le nombre d'animaux logés dans chaque cage tant pendant l'exposition aux substances chimiques que pendant la période d'observation qui y fait suite.

ii) Alimentation

La nourriture doit répondre à toutes les exigences alimentaires de l'espèce soumise à l'expérience. Lorsque des substances sont incorporées à la nourriture des animaux, la valeur nutritionnelle de cette nourriture peut être réduite par suite d'une interaction entre la substance et un composant alimentaire.

La possibilité d'une telle interaction doit être considérée lorsqu'on interprète les résultats de l'essai.

Les impuretés contenues dans le régime alimentaire et connues pour influencer la toxicité ne devraient pas être présentes en concentration telle qu'elles pourraient interférer.

B. 1. TOXICITÉ AIGUË — ADMINISTRATION ORALE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées oralement, par gavage, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité dus à la substance. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience. Cette méthode est essentiellement destinée aux études pratiquées sur des rongeurs.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Préparations

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, des jeunes animaux adultes et sains sont répartis au hasard entre les différents lots d'expérience.

Si nécessaire, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé d'utiliser une solution aqueuse chaque fois que possible, sinon on peut utiliser une solution dans de l'huile végétale, éventuellement une solution dans d'autres véhicules, ou une suspension. En ce qui concerne les véhicules non aqueux, leur toxicité doit être connue ou être déterminée avant ou pendant l'essai. Normalement, pour les rongeurs, le volume ne doit pas dépasser 10 millilitres par kilogramme de poids corporel, sauf s'il s'agit de solutions aqueuses, pour lesquelles on peut utiliser jusqu'à 20 millilitres par kilogramme. La variabilité du volume d'essai doit être minimisée par l'ajustement de la concentration, de manière à garantir un volume constant pour toutes les doses étudiées.

1.6.2. Conditions expérimentales.

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce préférée.

Il faut utiliser des souches de laboratoire courantes. Pour chaque sexe, la différence de poids entre les animaux utilisés pour un essai ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne appropriée.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix rongeurs au moins (5 femelles et 5 mâles) sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides.

1.6.2.3. Doses

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière appropriée pour produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination valable de la DL_{50} .

1.6.2.4. Essai de limite

On obtient une estimation adéquate du potentiel de toxicité orale aiguë pour la plupart des utilisations si l'on n'observe aucune mortalité due à la substance, dans un lot traité (5 animaux par sexe), dans les 14 jours qui suivent l'administration d'une dose de 5 000 milligrammes par kilogramme.

1.6.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit au moins s'étendre sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être fixée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout s'il y a tendance à ce que la mort soit retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être à jeun avant l'administration de la substance. Dans le cas du rat, celui-ci doit être privé de nourriture pendant la nuit qui précède l'administration de la substance; pour des animaux ayant un métabolisme plus rapide, il convient d'écourter la période de jeûne; l'eau ne sera *pas limitée*. Le lendemain, les animaux doivent être pesés avant que la substance d'essai leur soit administrée par gavage à raison d'une dose unique par lot. Si l'administration en une dose unique n'est pas possible, la substance peut être administrée par fractions plus petites pendant une période ne dépassant pas 24 heures. Après l'administration de la substance, les animaux peuvent encore être privés de nourriture pendant 3 à 4 heures. Si la dose est administrée par fractions pendant un certain laps de temps, il peut s'avérer nécessaire d'alimenter et de faire boire les animaux en fonction de la durée du traitement. Une fois la substance administrée, les observations sont effectuées et enregistrées de façon systématique, en établissant, si possible, une fiche individuelle pour chaque animal. Les observations doivent être effectuées fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être fait au moins une fois par jour ouvrable. D'autres observations doivent être faites quotidiennement en agissant de façon à réduire la perte d'animaux pour l'étude, par exemple, autopsie ou réfrigération des animaux trouvés morts, ainsi qu'isolement ou sacrifice des animaux faibles ou moribonds. L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et les comas doivent être observés avec une attention particulière. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible.

Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés en vue d'un examen histopathologique.

2. DONNÉES

Les données devraient être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres symptômes de toxicité, la description des effets toxiques et les résultats de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et enregistré peu de temps avant l'administration de la substance d'essai puis une fois par semaine et au moment de la mort. Les notifications de poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. La DL_{50} peut être déterminée par application d'une méthode reconnue. L'évaluation des données doit inclure la relation, si elle existe,

entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et l'apparition ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les anomalies du comportement et cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, la mortalité et tous autres effets toxiques.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal devra contenir, si possible, les renseignements suivants :

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (avec indication des concentrations et, le cas échéant, du véhicule),
- tableau des données, réponses par sexe et par dose (nombre d'animaux mourants, nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité, nombre d'animaux exposés),
- moment de la mort après l'administration de la dose,
- résultats des observations quotidiennes,
- valeur de la DL_{50} , pour chaque sexe, déterminée au quatorzième jour (avec indication précise de la méthode de calcul),
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50} ,
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet),
- résultats d'autopsie,
- constatations histopathologiques,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 2. TOXICITÉ AIGUË — ADMINISTRATION PAR INHALATION**1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés à la substance d'essai à des concentrations croissantes pendant une période déterminée, une seule concentration étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité dus à la substance. Les animaux qui meurent pendant l'expérience sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant l'épreuve, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre les différents lots. Il n'est pas nécessaire de les soumettre à une exposition simulée, à moins que le dispositif d'exposition utilisé ne l'exige. Au besoin, on peut ajouter à la substance d'essai un véhicule adéquat en vue d'obtenir une concentration appropriée de celle-ci dans l'atmosphère et il faut alors prévoir un groupe témoin pour ce véhicule. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le dosage, ils doivent être réputés non toxiques. Des données déjà disponibles peuvent être utilisées, si c'est approprié.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Sauf contre-indications, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser des souches de laboratoire courantes. Pour chaque sexe, la différence de poids entre les animaux utilisés pour un essai ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne appropriée.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix rongeurs au moins (5 femelles et 5 mâles) sont utilisés pour chaque niveau de concentrations. Les femelles doivent être nullipares et non gravides.

1.6.2.3. Concentrations d'exposition

Les concentrations doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière appropriée pour produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe concentration/mortalité et, si possible, permettre une détermination valable de la CL₅₀.

1.6.2.4. Essai de limite

Si une exposition de 5 mâles et de 5 femelles à une concentration de 20 milligrammes par litre d'un gaz ou 5 milligrammes par litre d'un aérosol ou de particules pendant 4 heures ou, lorsque cela n'est pas possible en raison des propriétés chimiques ou physiques, voire explosives, de la substance d'essai, une exposition à la concentration maximale possible ne cause la mort d'aucun animal en 14 jours, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. Durée de l'exposition

La durée de l'exposition est d'au moins 4 heures.

1.6.2.6. Dispositif expérimental

Les animaux doivent être exposés à la substance au moyen d'un dispositif d'inhalation produisant un courant d'air assurant au moins 12 renouvellements de l'air par heure, une teneur suffisante en oxygène et la répartition uniforme du produit d'essai dans l'air. Si l'on utilise une chambre, celle-ci doit être conçue de manière à éviter autant que possible l'entassement des animaux et à leur assurer une exposition maximale, par inhalation, à la substance d'essai. En règle générale, pour assurer la stabilité de l'atmosphère d'une chambre, le « volume » total des animaux d'expérience ne doit pas dépasser 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition oro-nasal, de la tête seule ou du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition permettent d'éviter l'absorption de la substance d'essai par d'autres voies.

1.6.2.7. Période d'observation

La période d'observation doit au moins s'étendre sur 14 jours. Cependant, cette durée ne doit pas être fixée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des réactions de toxicité, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout s'il y a une tendance à ce que la mort soit retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Peu de temps avant l'exposition, les animaux sont pesés, puis exposés dans la chambre d'exposition à la concentration d'essai dans l'appareillage décrit, pendant une durée d'au moins 4 heures, après stabilisation de la concentration. Celle-ci doit être rapide. La température à laquelle s'effectue l'essai doit être maintenue à 22 °C ± 3 °C.

L'idéal serait de maintenir l'humidité relative entre 30 et 70 %, mais, dans certains cas (par exemple essai d'aérosols), cela peut se révéler impossible. Les animaux doivent être privés de nourriture et d'eau pendant l'exposition. Il convient d'utiliser un système d'inhalation qui fonctionne dans des conditions dynamiques et qui est muni d'un dispositif approprié de contrôle analytique de la concentration.

Pour déterminer les concentrations d'exposition appropriées, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Le système doit permettre de créer des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible. Le débit d'air doit être réglé de manière à assurer des conditions uniformes dans toute la chambre d'exposition.

Il convient de mesurer ou de surveiller :

- a) le débit d'air (en permanence);
- b) la concentration réelle de la substance d'essai dans la zone de respiration. Pendant la période d'exposition, la concentration ne doit pas varier de plus de $\pm 15\%$ par rapport à la valeur moyenne. Toutefois, dans le cas de poussières ou de certains aérosols, ce degré de contrôle peut ne pas être obtenu et un écart plus grand est alors acceptable. Les substances particulières et les aérosols doivent être analysés aussi souvent que nécessaire en vue de déterminer (au moins une fois) la granulométrie des particules;
- c) température et humidité;
- d) les observations ont lieu pendant et après l'exposition et sont enregistrées systématiquement; une fiche individuelle doit être établie pour chaque animal. Les observations doivent être fréquentes le premier jour. Un examen clinique attentif doit être effectué au moins une fois par jour ouvrable. D'autres observations complémentaires doivent être faites quotidiennement et des mesures appropriées doivent être prises afin de réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple autopsie ou réfrigération des animaux trouvés morts ainsi qu'isolement ou sacrifice des animaux faibles ou moribonds.

L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. La respiration, les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et les comas doivent être observés avec une attention particulière. Le moment de la mort doit être enregistré avec autant de précision que possible. Le poids de chaque animal doit être déterminé toutes les semaines après l'exposition ainsi qu'au moment de la mort.

Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de celle-ci font l'objet d'une autopsie portant, en particulier, sur toutes modifications des voies respiratoires supérieures et inférieures. Toutes les modifications doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés en vue d'un examen histopathologique.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres symptômes de toxicité, la description des effets toxiques et les résultats d'autopsie. Les changements de poids doivent être calculés et enregistrés lorsque la survie dépasse une journée. La CL_{50} doit être déterminée à l'aide d'une méthode reconnue. L'évaluation des données doit notamment mettre en évidence, si elle existe, la relation entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et l'incidence ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les modifications du comportement, les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, la mortalité et tous autres effets toxiques.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales :

description du dispositif d'exposition, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement de l'air et, le cas échéant, modalités du séjour des animaux en chambre d'essai.

Les dispositifs utilisés pour mesurer la température, l'humidité ainsi que la concentration et la granulométrie des particules et des aérosols doivent être décrits.

Données relatives à l'exposition :

elles doivent être présentées sous la forme d'un tableau indiquant les valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple, écart type); elles doivent inclure :

- a) débit d'air à travers le dispositif d'inhalation,
- b) température et humidité de l'air,

- c) concentrations nominales (quantité totale de substance d'essai introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air),
 - d) le cas échéant, nature du véhicule,
 - e) concentrations réelles dans la zone de respiration,
 - f) dimensions médianes des particules,
 - g) durée de stabilisation,
 - h) durée d'exposition,
- tableau indiquant les réactions, par sexe et par niveau d'exposition (nombre d'animaux mourants, nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité, nombre d'animaux exposés),
 - moment de la mort pendant ou après l'exposition,
 - résultats des observations quotidiennes,
 - valeur de la CL_{50} pour chaque sexe déterminée à la fin de la période d'observation (avec indication précise de la méthode de calcul utilisée),
 - intervalle de confiance de 95 % pour la CL_{50} ,
 - courbe concentration/mortalité et pente de cette courbe (si la méthode de calcul le permet),
 - résultats d'autopsie,
 - toutes constatations histopathologiques,
 - discussions des résultats,
 - interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 3. TOXICITÉ AIGUË — ADMINISTRATION CUTANÉE**1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

Des doses croissantes de la substance d'essai sont administrées par application cutanée à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. On observe ensuite les effets et la mortalité causée par la substance. Les animaux qui meurent pendant l'expérience sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant l'essai, des jeunes animaux adultes et sains sont répartis au hasard entre les différents lots d'expérience. Vingt-quatre heures environ avant l'épreuve, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale du tronc des animaux, en évitant toute lésion de la peau susceptible de modifier sa perméabilité. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Lorsque le test concerne des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à garantir un bon contact avec la peau. Si l'on utilise un véhicule, son influence sur la pénétration de la substance dans la peau doit être prise en considération. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

On peut utiliser des rats ou des lapins adultes. On peut également utiliser d'autres espèces mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation. Il faut utiliser des souches de laboratoire courantes. Pour chaque sexe, la différence de poids entre les animaux utilisés pour un test ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne appropriée.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles), ayant une peau saine et intacte, doivent être utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut parfois se justifier, surtout s'il s'agit de lapins.

1.6.2.3. Doses

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de manière à produire des lots présentant une gamme d'effets toxiques et de taux de mortalité. Tout effet irritant ou corrosif doit être pris en considération lors du choix des doses. Les données doivent être suffisantes pour permettre de tracer une courbe doses/réponses et, si possible, permettre une détermination valable de la DL₅₀.

1.6.2.4. Essai de limite

Si, lors d'un essai préliminaire, l'application de la substance, à dose égale ou supérieure à 2 000 milligrammes par kilogramme sur la peau intacte d'au moins 5 animaux par sexe, n'entraîne aucun effet létal dû à la substance dans les 14 jours, on peut juger inutile poursuivre l'expérience à d'autres doses.

1.6.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit au moins s'étendre sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être fixée de façon rigide. Elle doit être déterminée d'après les réactions de toxicité, leur vitesse d'apparition et la durée de la période de guérison; elle peut donc être prolongée en cas de besoin. Le moment où les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée et le moment de la mort sont importants, surtout s'il y a tendance à ce que la mort soit retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface à peu près égale à 10 % de la surface totale du corps. Dans le cas de substances hautement toxiques, la surface traitée peut être moindre, mais la substance d'essai doit être appliquée de manière à former un film aussi fin et uniforme que possible.

Les substances d'essai doivent être maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non irritant pendant une période de 24 heures. La partie traitée doit, en outre, être convenablement couverte, de manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. On peut utiliser des appareils de contention pour empêcher les animaux d'ingérer la substance d'essai mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À la fin de la période d'application de la substance d'essai, celle-ci doit être éliminée, si possible avec de l'eau ou au moyen d'un autre procédé de nettoyage de la peau.

Les observations doivent être enregistrées systématiquement au fur et à mesure qu'elles sont effectuées, en établissant une fiche individuelle pour chaque animal. Les animaux doivent être observés fréquemment le premier jour. Un examen clinique attentif doit être effectué au moins une fois par jour ouvrable. D'autres observations doivent être faites quotidiennement et des mesures appropriées doivent être prises afin de réduire le nombre des animaux perdus pour l'étude, par exemple, autopsie ou réfrigération des animaux trouvés morts ainsi qu'isolement ou sacrifice des animaux faibles ou moribonds. L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. Les tremblements, les convulsions, la salivation, les diarrhées, la léthargie, le sommeil et les comas doivent être observés avec une attention particulière. Le moment de la mort doit être noté avec autant de précision que possible. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être enregistrées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés en vue d'un examen histopathologique.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot, le nombre d'animaux au début du test, le moment de la mort de chaque animal, le nombre d'animaux présentant d'autres symptômes de toxicité, la description des effets toxiques et les résultats d'autopsie.

Le poids de chaque animal doit être déterminé et noté peu de temps avant l'application de la substance d'essai, puis une fois par semaine et au moment de la mort; les changements de poids doivent être calculés et enregistrés lorsque la survie dépasse une journée. La DL_{50} doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure les relations, s'il en existe, entre l'exposition des animaux à la substance d'essai et l'incidence ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les modifications du comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, les effets sur la mortalité et tout autre effet toxique.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants:

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau),
- doses (avec indication des concentrations et, le cas échéant, du véhicule),
- tableau des données, réponses par sexe et par dose (nombre d'animaux mourants, nombre d'animaux présentant des symptômes de toxicité, nombre d'animaux exposés),
- moment de la mort après l'administration de la dose,
- résultats des observations quotidiennes,
- valeur de la DL_{50} pour chaque sexe, déterminée au quatorzième jour, avec indication précise de la méthode de calcul,
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50} (s'il est possible de la déterminer),
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe, si la méthode de calcul le permet,
- résultats d'autopsie,
- constatations histopathologiques,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 4. TOXICITÉ AIGUË**IRRITATION DE LA PEAU****1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

La substance d'essai est appliquée en une dose unique sur la peau de plusieurs animaux d'expérience, chacun d'entre eux constituant son propre témoin. L'importance de la réaction d'irritation est observée et cotée après un laps de temps déterminé; elle fait l'objet d'une description détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La période d'observation doit être suffisamment longue pour pouvoir évaluer complètement le caractère réversible des effets observés.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Vingt-quatre heures environ avant l'essai, on tond ou l'on rase les poils de la région dorsale de l'animal.

Lors de cette opération, il faut veiller à ne pas érafler la peau. Seuls des animaux présentant une peau saine et intacte doivent être utilisés.

Si l'on soumet à l'essai des substances solides (qui, si nécessaire, peuvent être pulvérisées), la substance d'essai doit être suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, pour garantir un bon contact avec la peau. Dans ce dernier cas, il faut tenir compte de l'influence du véhicule sur la réaction d'irritation cutanée provoquée par la substance d'essai. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

Il n'est pas nécessaire de soumettre les substances fortement acides ou alcalines à un test d'irritation primaire de la peau, du fait du caractère prévisible de leurs propriétés corrosives. Il est inutile de soumettre à l'essai les substances qui se sont révélées très toxiques par voie cutanée.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Bien que plusieurs espèces de mammifères puissent être utilisées, le lapin albinos est l'espèce préférée.

1.6.2.2. Nombre d'animaux

On utilise au moins trois animaux adultes et sains. L'utilisation d'un plus grand nombre peut se révéler nécessaire pour préciser des réponses équivoques.

1.6.2.3. Doses

Sauf contre-indications, un volume de 0,5 millilitre de substance liquide ou de 0,5 gramme de substance solide ou semi-solide est appliquée à l'endroit choisi. Il n'est pas nécessaire de prévoir un lot témoin. Les zones de peau voisines, non traitées, de chaque animal, servent de témoin.

1.6.2.4. Période d'observation

La durée de la période d'observation ne doit pas être fixée de façon rigide, elle doit être suffisamment longue pour évaluer complètement le caractère réversible ou irréversible des effets observés mais ne doit pas normalement excéder 14 jours.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être appliquée sur une petite surface cutanée (environ 6 centimètres carrés) et recouverte d'un petit carré de gaze maintenu en place par du sparadrap non irritant. S'il s'agit de liquides ou de certaines pâtes, il peut se révéler nécessaire d'étendre tout d'abord la substance d'essai sur le carré de gaze, puis d'appliquer celui-ci sur la peau. Le carré de gaze doit être maintenu au contact de la peau au moyen d'un pansement semi-occlusif approprié pendant toute la période d'exposition. L'utilisation d'un pansement occlusif peut cependant être jugée nécessaire dans certains cas. Il faut empêcher l'animal d'atteindre le carré de gaze et d'ingérer/inhaler les substances d'essai.

La durée d'exposition est de 4 heures. Si la substance est suspectée de produire une réaction cutanée sévère (par exemple d'être corrosive), la durée de l'exposition devra être réduite (par exemple à 1 heure ou à 3 minutes).

Lorsqu'une période d'exposition est inférieure à quatre heures et qu'une réaction cutanée prononcée est observée, il n'est pas nécessaire de répéter l'expérience en utilisant une période d'exposition de 4 heures. Des expositions plus longues peuvent être indiquées sous certaines conditions, par exemple modes d'utilisation et d'exposition prévus pour l'homme. À l'issue de la période d'exposition, la substance d'essai doit être éliminée, si possible, avec de l'eau ou avec un solvant approprié en prenant soin de ne modifier ni la réponse existante ni l'intégrité de l'épiderme.

1.6.3.1. Observation et cotation

L'observation des manifestations érythémateuses et oedémateuses ainsi que leur cotation doivent être effectués 30 à 60 minutes, puis 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du pansement. Les réactions d'irritations sont cotées et enregistrées d'après l'échelle figurant dans le tableau en appendice. D'autres observations peuvent se révéler nécessaires, pour déterminer le caractère réversible des réactions. Outre ces observations concernant l'irritation, toute lésion grave telle que corrosion (destruction irréversible du tissu de la peau) et tout autre effet toxique doivent faire l'objet d'une description complète.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque animal, les cotations pour l'érythème et l'oedème durant toute la période d'observation. Il y a lieu d'enregistrer toute lésion grave, une description de l'intensité et de la nature de l'irritation, de la corrosion, de leur réversibilité ainsi que tout autre effet toxique observé.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales (y compris les propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance, le mode de préparation et le nettoyage de la peau),
- tableau des données relatives à la réaction d'irritation chez chaque animal lors de chaque observation (par exemple 1, 24, 48 et 72 heures après enlèvement du pansement),
- description de toute lésion grave observée, corrosion incluse,
- description de l'intensité et de la nature de l'irritation observée et toute constatation histopathologique,
- description de tout effet toxique autre qu'une irritation du derme,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

Appendice

TABLEAU: NOTATION DE LA RÉACTION CUTANÉE

Érythème et escarrification

	Valeur
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (couleur rouge violacée) à escarrification légère (lésion en profondeur)	4

Formation d'un œdème

Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien défini par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de la région exposée)	4

B. 5. TOXICITÉ AIGUË**IRRITATION DES YEUX****1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

La substance d'essai est appliquée sous forme d'une dose unique sur l'un des yeux de chacun des animaux d'expérience; l'œil non traité est utilisé comme témoin. Le degré d'irritation est évalué et coté à intervalles déterminés, il fait ensuite l'objet d'une description permettant d'obtenir une estimation complète des effets. La période d'observation doit être suffisamment longue pour pouvoir évaluer complètement le caractère réversible ou irréversible des effets observés.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Les deux yeux de chaque animal d'expérience provisoirement sélectionné pour l'essai doivent être examinés au cours des 24 heures qui précèdent l'expérience. Les animaux présentant une irritation de l'œil, des défauts oculaires ou une lésion de la cornée préexistante ne doivent pas être utilisés.

Il n'est pas nécessaire de soumettre à l'essai d'irritation de l'œil les substances fortement alcalines ou acides qui ont montré une nette activité corrosive dans une étude d'irritation de la peau ou dans d'autres essais.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Bien que différents animaux d'expérience aient été utilisés, il est recommandé d'effectuer l'essai sur des lapins albinos adultes et sains.

1.6.2.2. Nombre d'animaux

Trois animaux au moins doivent être utilisés. Il peut se révéler nécessaire d'utiliser un plus grand nombre d'animaux pour préciser des réponses équivoques.

1.6.2.3. Doses

Si la substance à tester est un liquide, on utilise un volume de 0,1 millilitre. Pour les substances solides, les pâtes et les substances particulières, la quantité utilisée doit avoir un volume de 0,1 millilitre ou peser environ 0,1 gramme (le poids doit toujours être noté). Si la substance d'essai est solide ou granuleuse, elle doit être broyée en fine poussière. La mesure du volume des substances particulières doit être précédée d'un compactage léger, par exemple, en tapotant le récipient de mesure.

1.6.2.4. Période d'observation

La durée de la période d'observation ne doit pas être fixée de façon rigide. Elle doit être suffisamment longue pour évaluer le caractère réversible ou irréversible des effets observés et ne doit pas excéder normalement 21 jours à compter de l'instillation.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être instillée dans le cul-de-sac conjonctival de l'un des yeux de chaque animal, après avoir délicatement écarté la paupière inférieure du globe oculaire. Ensuite, on maintient doucement les paupières jointes, pendant une seconde environ, pour éviter l'écoulement de la substance. L'autre œil ne subit pas de traitement et sert de témoin.

Les yeux des animaux d'expérience ne doivent pas être rincés pendant les 24 heures qui suivent l'instillation de la substance à tester. Un rinçage peut au besoin être effectué au bout de la vingt-quatrième heure. Pour les substances dont le caractère irritant est mis en évidence par cet essai, la valeur de l'irrigation de l'œil comme moyen de diminuer l'effet irritant ou d'autres effets nuisibles peut être examinée. Il est dans ce cas recommandé d'utiliser six lapins. Chez trois d'entre eux, le rinçage sera effectué quatre secondes après instillation de la substance d'essai et, chez les trois autres lapins, 30 secondes après. Dans les deux lots, le rinçage durera 5 minutes et sera pratiqué en utilisant un volume et une vitesse d'écoulement qui ne crée pas d'altérations.

1.6.3.1. Observations et cotation

Les yeux doivent être examinés après 1, 24, 48 et 72 heures. Si aucune irritation ne se manifeste après 72 heures, il peut être mis fin à l'essai.

Une observation prolongée peut se révéler nécessaire en cas d'atteinte cornéenne persistante ou de toute autre irritation oculaire, afin de déterminer l'évolution des lésions et leur caractère réversible ou irréversible. Outre les observations relatives à la cornée, à l'iris et à la conjonctive, il y a lieu d'enregistrer et de décrire toutes les autres lésions observées. La cotation de la réaction oculaire (voir tableau) doit être enregistrée lors de chaque examen. La cotation des réponses oculaires peut donner lieu à diverses interprétations. Afin d'aider les laboratoires de recherche et les personnes chargées d'effectuer ou d'interpréter les observations, un guide illustré traitant des irritations oculaires peut être utilisé.

Pour faciliter l'examen des réactions, on peut utiliser une loupe binoculaire, une lampe, un biomicroscope ou tout autre appareil approprié. Après enregistrement des observations effectuées à la vingt-quatrième heure, l'examen des yeux de certains ou de tous les lapins peut être poursuivi au moyen de fluorescéine.

2. DONNÉES

Les données doivent être résumées sous la forme d'un tableau indiquant, pour chaque animal, les indices d'irritation au moment de l'observation indiquée, une description du degré et de la nature de l'irritation, la présence de lésions graves et tout effet non oculaire observé.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants:

- données relatives aux animaux (espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.),
- conditions expérimentales (y compris les propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance à tester),
- tableau des effets irritants/corrosifs relevés sur chaque animal au moment de chaque observation (par exemple 1, 24, 48 et 72 heures),
- description de toute lésion grave observée,
- description du degré et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observée, y compris leur réversibilité,
- description de la méthode utilisée pour évaluer l'irritation après 1, 24, 48 et 72 heures (par exemple, lampe à fente portative, biomicroscope, fluorescéine),
- description de tout effet local, non oculaire, observé,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

Appendice

TABLEAU: NOTATION DES LÉSIONS OCULAIRES

Cornée

<i>Opacité: degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses)</i>	
Pas d'ulcération ni d'opacité	0
Zones d'opacité (autres qu'un léger ternissement de l'éclat normal) dispersées ou diffuses, détails de l'iris nettement visibles	1
Zone translucide aisément discernable, détails de l'iris légèrement masqués	2
Zone nacrée, détails de l'iris complètement invisibles, dimension de la pupille à peine discernable	3
Cornée opaque, iris non discernable à travers l'opacité	4

Iris

Normal	0
Plis nettement plus profonds, congestion, hyperhémie péricornéenne modérée ou conjonctive injectée, n'importe lequel de ces symptômes ou toute combinaison de plusieurs d'entre eux, l'iris continuant de réagir à la lumière (une réaction lente est positive)	1
Absence de réactions à la lumière, hémorragie, destruction marquée (chacun de ces symptômes ou l'ensemble)	2

Conjonctive

<i>Rougeur (s'applique aux conjonctives palpébrale et oculaire, à la cornée et à l'iris)</i>	
Vaisseaux sanguins normaux	0
Nette hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins individuels difficilement discernables	2
Coloration rouge soutenue diffuse	3
<i>Chémosis: paupières et/ou membranes nyctitantes</i>	
Pas de tuméfaction	0
Tuméfaction supérieure à la normale (y compris membranes nyctitantes)	1
Tuméfaction évidente avec éversion partielle des paupières	2
Tuméfaction avec paupières presque à moitié fermées	3
Tuméfaction avec paupières plus qu'à moitié fermées	4

B. 6. TOXICITÉ AIGUË**SENSIBILISATION DE LA PEAU****1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode d'essai/méthode de maximalisation chez le cochon d'Inde

Après exposition initiale à la substance d'essai (période d'induction), les animaux sont soumis, 2 semaines après la dernière exposition d'induction, à une exposition déclenchante effectuée avec cette même substance en vue d'établir si un état d'hypersensibilité a été induit. La sensibilisation est déterminée par un examen de la réponse cutanée à l'exposition déclenchante.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai**1.6.1. Préparations**

De jeunes animaux sains (âgés de moins de 1 an) sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Avant d'administrer la substance, on tond ou l'on rase les poils dans la région de l'épaule, en évitant d'effleurer la peau.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

On utilise le cochon d'Inde albinos.

1.6.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou de l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, celles-ci doivent être nullipares et non gravides. 20 animaux sont utilisés pour le lot traité et 10 au moins pour le lot témoin. Si un plus petit nombre d'animaux est utilisé, il convient d'en justifier la raison.

1.6.2.3. Dose

La concentration de la substance d'essai est fixée en fonction de la concentration maximale qui peut être parfaitement tolérée lors de chaque phase d'induction.

La dose déclenchante ne doit induire aucune irritation cutanée chez les animaux non sensibilisés. Ces doses peuvent être déterminées à l'aide d'une étude préliminaire réduite (2 ou 3 animaux).

1.6.2.4. Période d'observation

Durant la période d'induction, on surveille la peau afin de contrôler les éventuels effets toxiques. Après l'exposition déclenchante, les réactions cutanées sont enregistrées après 48 et 72 heures.

1.6.3. *Mode opératoire*

Les animaux sont pesés avant la phase d'induction ainsi qu'à l'issue de l'essai. Les poils de la région de l'épaule sont rasés. La procédure comporte deux phases.

1.6.3.1. Induction

Jour 0 — groupe traité

Les injections intradermiques ci-après sont faites, par paire, dans la région de l'épaule, de sorte qu'une injection de chaque paire se situe de part et d'autre de la ligne médiane :

1. 0,1 millilitre d'adjuvant complet de Freund (ACF);
2. 0,1 millilitre de substance d'essai, le cas échéant dans un véhicule;
3. 0,1 millilitre de substance d'essai dans ACF.

Les injections 1 et 2 sont faites à proximité l'une de l'autre et le plus près possible de la tête tandis que l'injection 3 se situe vers la partie caudale de la surface soumise à l'épreuve.

Jour 0 — groupe témoin.

Les injections intradermiques ci-après sont faites, par paire, aux mêmes endroits que ci-avant :

1. 0,1 millilitre ACF;
2. 0,1 millilitre véhicule seul;
3. 0,1 millilitre véhicule dans ACF.

Septième jour — groupe traité

Les poils de la zone d'essai sont à nouveau rasés. Au moyen d'un véhicule approprié, la substance d'essai (au besoin, les liquides peuvent être directement appliqués) est versée sur un papier filtre, appliquée sur la surface retenue pour l'essai et maintenue en contact avec la peau au moyen d'un pansement approprié pendant 48 heures.

Septième jour — groupe témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée des poils. Seul le véhicule est appliqué, selon la même méthode, sur la surface, et est maintenu en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 48 heures.

1.6.3.2. Déclenchement

Vingt et unième jour

On rase les poils sur les flancs des animaux traités et des animaux témoins. Un pansement contenant la substance d'essai est appliqué sur le flanc gauche des animaux traités tandis qu'un pansement contenant uniquement le véhicule est appliqué sur le flanc droit. Les petits carrés de toile sont maintenus en contact avec la peau à l'aide d'un pansement approprié pendant 24 heures.

Le groupe témoin est exposé de manière identique.

Vingt-troisième et vingt-quatrième jours

21 heures après avoir enlevé le petit carré de toile, la surface soumise à l'essai est nettoyée et rasée, si nécessaire.

3 heures plus tard (soit 48 heures après le début de l'application déclenchante), on observe et on enregistre la réaction cutanée.

24 heures après cette observation, on procède à une seconde observation (72 heures) que l'on enregistre.

Pour préciser les résultats obtenus lors de la première phase déclenchante, il y a lieu d'envisager une seconde phase déclenchante, si nécessaire, avec un nouveau groupe témoin pour le véhicule, une semaine environ après la première épreuve.

1.6.3.3. Observation et notation

Toutes les réactions cutanées et toutes les observations inhabituelles résultant des phases d'induction et de déclenchement doivent être enregistrées et consignées dans le rapport.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque animal, les réactions cutanées relevées lors de chaque observation.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal

Le procès-verbal doit contenir les renseignements suivants:

- souche de cochon d'Inde utilisée,
- conditions expérimentales,
- nombre, âge et sexe des animaux,
- poids de chaque animal au commencement et à la fin de l'épreuve,
- chaque observation individuelle, y compris le cas échéant système de notation,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

Remarques

L'essai de maximalisation sur cochon d'Inde (GPMT) est un essai de type adjuvant largement utilisé. Bien que plusieurs autres méthodes, indiquées dans l'appendice, puissent être utilisées pour déceler l'aptitude d'une substance à provoquer une réaction de sensibilisation de la peau, le GPMT est considéré comme la méthode (de référence) préférée. La sensibilité de cette méthode et son aptitude à déceler les

éventuels sensibilisants de la peau humaine sont considérées comme importantes pour établir un système de classification de la toxicité applicable à la santé publique. Le choix de toute autre méthode doit être régi par des critères garantissant sa validité. Parmi ces critères, figure une réponse prévisible à des allergènes types tels que le 2,4-dinitrochlorobenzène ou la p-phénylènediamine, ou tout autre sensibilisant potentiel choisi en fonction de la classe de la substance testée.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier de manière adéquate toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation de la peau humaine et qui convienne à toutes les substances.

Certains facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, y compris son aptitude à pénétrer dans la peau, et ses modes de contact avec les sujets susceptibles d'être exposés doivent être pris en considération lors du choix d'un essai. Les essais utilisant des cochons d'Inde peuvent être subdivisés en épreuves de type adjuvant, dans lesquelles tout état allergique est potentialisé par la dissolution ou la mise en suspension de la substance à soumettre à l'essai dans l'adjuvant complet de Freund et en essai de type non adjuvant. Dans certains cas, il peut être indiqué de choisir un essai impliquant une application locale plutôt que l'injection intradermique utilisée dans l'épreuve de maximalisation sur cochon d'Inde. Dans ce cas, il convient également de prendre en considération les caractéristiques physiques de la substance d'essai et les conditions d'une exposition humaine possible.

Indépendamment de la méthode utilisée, la sensibilité de la souche de cochons d'Inde utilisée pour l'essai de sensibilisation cutanée doit être vérifiée à intervalles réguliers (6 mois) à l'aide de sensibilisants puissants et modérés, connus, conduisant à un nombre satisfaisant de réponses positives.

Appendice

Épreuve	Draize	Adjuvant complet de Freund (ACF)	Optimisation Maurer	Buehler	Épreuve épicutanée à l'air libre	Adjuvant fractionné
<i>Espèce</i>	Cochon d'Inde	Cochon d'Inde	Cochon d'Inde	Cochon d'Inde	Cochon d'Inde	Cochon d'Inde
<i>Voie d'administration</i>	intradermique (id)	intradermique (id)	intradermique (id)	épicutanée (ec)	épicutanée (ec)	id et ec
<i>Nombre d'animaux dans le lot d'expérience</i>	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
<i>Nombre de lots d'expérience</i>	1	1	1	1	1 à 6	1
<i>Nombre d'animaux dans le lot témoin</i>	20	8—10	10—10	10—20	6—8	10—20
<i>Exposition d'induction — voie</i>	id	id	id	dermique	dermique	id et dermique
<i>Nombre d'expositions</i>	10	5	9	3	20 ou 21	4
<i>Période d'exposition</i>	—	—	24 h	6 h chaque fois	continue	48 h chaque fois
<i>Type de pansement</i>	—	—	—	fermé	à l'air libre	fermé
<i>Lot d'expérience</i>	SE ⁽¹⁾	SE dans ACF	SE dans ACF	SE	SE	SE
<i>Lot témoin</i>	néant	ACF seul	néant	néant	Véhicule (v) seul	néant
<i>Zone soumise à l'épreuve</i>	flanc gauche	flanc droit	dos	flanc gauche	flanc droit	épaule
<i>Fréquence</i>	tous les 2 jours	tous les 2 jours	tous les 2 jours	tous les 7 jours	quotidiennement	0, 2, 4, 7 jours
<i>Durée</i>	0—18 jours	0—8 jours	0—21 jours	0—14 jours	0—20 jours	0—7 jours
<i>Concentration</i>	2—10 deux fois celle de la première	la même partout	0,1 ml de 0,1 %	la même partout	la même à l'intérieur de chaque lot, différente d'un lot à l'autre	la même partout
<i>Exposition de déclenchement — Voie</i>	id	dermique	id	dermique	dermique	dermique
<i>Nombre d'expositions</i>	1	2	2	1	2	1
<i>Jours</i>	35	22 et 35	14 et 28	28	21 et 35	20
<i>Période d'exposition</i>	—	—	24 h	6 h	—	24 h
<i>Type de pansement</i>	—	à l'air libre	—	fermé	à l'air libre	fermé
<i>Groupe(s) d'expérience</i>	SE	SE	SE	SE	SE	SE
<i>Groupe témoin</i>	SE	SE	SE	SE	SE	SE
<i>Surface soumise à l'épreuve</i>	flanc droit	flanc gauche	dos, nouvelle zone	flanc droit	flanc gauche	épaule
<i>Concentration</i>	la même que la première	4 différentes	0,1 ml de 0,1 %	la même que pour l'induction	4 différentes	la moitié de celle utilisée pour l'induction
<i>Évaluation (nombre d'heures après l'exposition de déclenchement)</i>	24, 48	24, 48, 72	24	24, 48	24, 48 et/ou 72	24, 48

⁽¹⁾ SE = substance d'essai.

B. 7. TOXICITÉ SUBAIGUË — ADMINISTRATION ORALE**1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

La substance d'essai est administrée quotidiennement, par voie orale, à doses croissantes à plusieurs lots d'animaux d'expérience, à raison d'une dose par lot durant une période de 28 jours. Pendant la période d'administration, les animaux sont observés chaque jour afin de déceler les effets toxiques. Les animaux qui meurent pendant l'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'essai.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode d'essai**1.6.1. Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre les lots soumis. Les substances d'essai peuvent être administrées dans la nourriture, par gavage, en capsules ou dans l'eau de boisson. Les doses doivent être administrées aux animaux de la même façon durant toute la durée de l'expérience. Si, pour faciliter l'administration, on utilise un véhicule ou d'autres additifs, ceux-ci doivent être réputés non toxiques. Des données publiées peuvent, si nécessaire, être utilisées.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Sauf contre-indications, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser de jeunes animaux, sains, d'une souche de laboratoire courante; dans les conditions idéales, la substance doit être administrée avant que les rats n'atteignent l'âge de 6 semaines; ils ne peuvent, en aucun cas, être âgés de plus de 8 semaines. Au début de l'expérience, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter à ce nombre les animaux qu'il est prévu de sacrifier. De plus, un lot satellite de 10 animaux (5 par sexe) peut être traité à la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Doses

On utilise au moins 3 doses et un témoin. À l'exception de la substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les sujets des lots d'expérience. Si l'on utilise un véhicule pour faciliter l'administration, il sera administré aux témoins de la même manière que pour les lots traités et le volume reçu correspondra à celui administré au lot traité avec la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit produire des effets toxiques n'entraînant pas (ou rarement) la mort. La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'informations concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la dose moyenne doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, celles-ci doivent être suffisamment espacées pour entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant aux doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans le lot témoin, l'incidence de la mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (ppm ou mg/kg) soit une dose constante, en rapport avec le poids corporel des animaux; la méthode choisie doit être précisée. Dans le cas d'une substance administrée par gavage, les doses doivent être administrées chaque jour au même moment. Les doses doivent faire l'objet d'une adaptation (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant, en rapport avec le poids corporel de l'animal.

1.6.2.4. Essai de limite

Si une expérience de 28 jours effectuée d'après la méthode décrite ci-avant, à une dose de 1 000 milligrammes par kilogramme de poids corporel par jour ou à un niveau de dose plus élevé, en fonction de l'exposition possible pour l'homme (lorsqu'on la connaît) ne révèle aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de poursuivre l'expérience. Lorsqu'il s'agit de substances faiblement toxiques, administrées avec le régime alimentaire, il est important de s'assurer que leur quantité ou leurs propriétés n'interfèrent pas avec les exigences nutritionnelles normales.

1.6.2.5. Période d'observation

Tous les animaux doivent faire l'objet d'une observation quotidienne; les symptômes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être consignés. Le moment de la mort et le moment où les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent doivent être consignés.

1.6.3. Mode opératoire

Les doses de substances d'essai sont administrées aux animaux idéalement 7 jours sur 7 durant une période de 28 jours. Les animaux des lots satellites prévus pour des observations complémentaires doivent être gardés pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de déceler la récupération ou la persistance des effets toxiques.

L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications des poils, de la peau, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. La consommation alimentaire (et la consommation d'eau lorsque la substance à tester est administrée dans l'eau de boisson) ainsi que le poids des animaux doivent être déterminés chaque semaine.

Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que, dans la mesure du possible, ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place à l'issue de l'expérience. Tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds sont immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période de l'essai sur tous les animaux (y compris les témoins):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;
2. déterminations biochimiques cliniques du sang comprenant au moins un critère concernant l'exploration des fonctions hépatique et rénale: alanine aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) et aspartate aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo-oxaloacétique) du sérum, azote uréique, albumine, créatinine plasmatique, bilirubine totale et protéines sériques totales.

Les autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose, les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.3.1. Autopsie

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie générale. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Le foie, les reins, la rate, les glandes surrénales et le cœur ainsi que tout autre organe présentant des lésions macroscopiques ou des modifications volumétriques doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.3.2. Examen histopathologique

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique des organes et des tissus conservés.

Les organes et les tissus, présentant des lésions induites par la substance à tester au niveau de dose le plus élevé, doivent être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout lot satellite doivent faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les autres lots traités.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,
- conditions expérimentales,
- doses (y compris, le cas échéant, véhicule) et concentrations,
- réponse toxique par sexe et par dose,
- niveau n'entraînant aucun effet, si possible,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,
- effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,
- quantités de nourriture et poids corporel,
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, lorsque cela se révèle possible,
- discussion sur les résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 8. TOXICITÉ SUBAIGUË — ADMINISTRATION PAR INHALATION**1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substance de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode

Plusieurs groupes d'animaux sont exposés quotidiennement, pendant une période déterminée, à la substance d'essai en concentrations croissantes, à raison d'une concentration par lot, pendant une période de 28 jours. Lorsqu'on utilise un véhicule en vue d'obtenir une concentration appropriée de la substance d'essai dans l'atmosphère, il y a lieu de prévoir un lot témoin pour le véhicule. Durant la période d'administration, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience sont autopsiés de même que ceux encore en vie à l'issue de l'expérience.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard entre le nombre de lots nécessaires. Au besoin, un véhicule approprié peut être ajouté à la substance à tester en vue d'obtenir une concentration appropriée dans l'atmosphère. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter le dosage, ils doivent être réputés non toxiques. Des données publiées peuvent, si nécessaire, être utilisées.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Sauf contre-indications, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser de jeunes animaux, sains, d'une souche de laboratoire courante. Au début de l'expérience, la différence de poids entre les animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne appropriée.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles) doivent être utilisés pour chaque groupe d'expérience. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si on prévoit de sacrifier certains animaux en cours

d'expérience, il y a lieu d'ajouter les animaux qu'il est prévu de sacrifier. De plus, un groupe satellite de 10 animaux (5 animaux par sexe) peut être traité avec la dose la plus élevée pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 14 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Concentrations d'exposition

Trois concentrations au moins sont nécessaires ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule (correspondant à la concentration du véhicule au niveau d'exposition le plus élevé). À l'exception de l'inhalation de la substance d'essai, les animaux du groupe témoin doivent être traités de la même façon que les sujets du groupe d'expérience. La dose la plus élevée doit produire des effets toxiques n'entraînant pas, ou rarement, la mort. La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une information concernant l'exposition de l'homme, la concentration la plus faible doit être supérieure à cette valeur. Dans les conditions idéales, la concentration intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs concentrations intermédiaires, les concentrations doivent être suffisamment espacées pour entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots à concentrations faible et intermédiaire ainsi que dans les lots témoins, l'incidence de la mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

1.6.2.4. Période d'exposition

L'exposition quotidienne doit être de 6 heures mais d'autres durées peuvent se révéler nécessaires pour répondre à certaines exigences spécifiques.

1.6.2.5. Équipement

Les animaux doivent être exposés à la substance d'essai au moyen d'un dispositif d'inhalation conçu pour assurer un flux d'air continu ou au moins 12 renouvellements de l'air par heure, garantissant une teneur en oxygène appropriée et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Si l'on utilise une chambre, celle-ci doit être conçue de manière à réduire l'entassement des animaux d'expérience et à leur assurer une exposition maximale, par inhalation, à la substance d'essai. En règle générale, on assure la stabilité de l'atmosphère d'une chambre en veillant à ce que le « volume » total des animaux d'expérience ne dépasse pas 5 % du volume de la chambre d'essai. On peut aussi avoir recours à un système d'exposition oronasal, de la tête seulement ou du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition cités permettent de réduire la pénétration par d'autres voies.

1.6.2.6. Période d'observation

Les animaux d'expérience devront être observés quotidiennement, en vue de déceler les symptômes de toxicité, durant toute la période de traitement et de récupération. Le moment de la mort ainsi que celui auquel les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent doivent être enregistrés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux sont quotidiennement exposés à la substance d'essai à raison de 5 à 7 jours sur 7 pendant une période de 28 jours. Les animaux de tout groupe satellite destiné à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de déceler la guérison ou la persistance des effets toxiques. La température à laquelle s'effectue l'épreuve doit être maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Dans les conditions optimales, l'humidité relative doit être maintenue entre 30 et 70 % mais, dans certains cas, cela peut se révéler impossible (par exemple, essais sur des aérosols). Pendant l'exposition, les animaux ne doivent recevoir ni nourriture ni eau.

Il y a lieu d'utiliser un système d'inhalation qui fonctionne dans des conditions dynamiques comportant un dispositif approprié de contrôle analytique de la concentration. Pour déterminer les concentrations

d'exposition appropriées, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Le débit devra être ajusté pour assurer des concentrations homogènes à travers toute la chambre. Le système doit permettre d'obtenir des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible.

Il y a lieu de mesurer et de contrôler :

- a) le débit d'air (en permanence);
- b) la concentration réelle de la substance d'essai mesurée dans la zone de respiration. Durant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne doit pas varier de plus de $\pm 15\%$ par rapport à la valeur moyenne. Cependant, dans le cas de poussières et d'aérosols, ce degré de contrôle peut ne pas être atteint et un écart plus grand pourra alors être accepté. Durant toute la durée de l'expérience, il faut garder les concentrations quotidiennes aussi constantes que possible. On mesure la répartition granulométrique des particules et/ou aérosol aussi souvent qu'il le faut pour estimer la stabilité de celle-ci;
- c) température et humidité;
- d) des observations ont lieu pendant et après l'exposition et sont enregistrées systématiquement; des données individuelles doivent être conservées pour chaque animal. Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les symptômes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être enregistrés. L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications des poils et de la fourrure, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. Le poids des animaux doit être déterminé chaque semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation alimentaire chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des groupes traités non satellites sont autopsiés. Les animaux moribonds doivent être immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de l'essai sur tous les animaux (y compris les animaux témoins):

- i) examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire, ainsi qu'une étude de la coagulation;
- ii) déterminations biochimiques cliniques du sang comprenant au moins un critère concernant l'exploration des fonctions hépatique et rénale: alanine aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) et aspartate aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo-oxalacétique) du sérum, azote uréique, albumine, créatinine plasmatique, bilirubine totale et protéines sériques totales. Les autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose, les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique, etc. D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets toxiques observés.

1.6.3.1. Autopsie

Tous les animaux d'expérience doivent être soumis à une autopsie générale. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés, à l'état humide, le plus rapidement possible après la dissection, afin d'éviter le dessèchement. Les organes et les tissus doivent être conservés dans un milieu approprié permettant d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs: les voies respiratoires, le foie, les reins, la rate, les glandes surrénales, le cœur, de même que tous les organes présentant des lésions importantes ou des modifications volumétriques. Le rhino-pharynx et les poumons doivent être prélevés entiers, pesés et traités au moyen d'un fixateur approprié permettant de conserver la structure pulmonaire. Une perfusion additionnée de fixateur est considérée comme une méthode efficace.

1.6.3.2. Examen histopathologique

Pour le lot exposé à la concentration la plus élevée et le(s) lot(s) témoin(s), il faut pratiquer un examen histologique des organes et des tissus conservés. Les organes et les tissus présentant des lésions induites par la substance à tester à la concentration la plus élevée doivent être examinés dans tous les groupes ayant été exposés à des concentrations plus faibles. Les animaux de tous les groupes satellites doivent faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels des lésions ont été constatées dans les autres lots traités.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

— espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.,

— conditions expérimentales :

description de l'appareil d'exposition, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système générateur de particules et d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'air expiré et, le cas échéant, modalités du séjour des animaux en chambre d'essai. L'équipement utilisé pour mesurer la température et, si nécessaire, la stabilité des concentrations d'aérosols et la granulométrie des particules doit être décrit.

Données relatives à l'exposition :

elles doivent être présentées sous la forme d'un tableau indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple, écart type); elles doivent inclure :

a) les débits d'air à travers le dispositif d'inhalation,

b) la température et l'humidité de l'air,

c) les concentrations nominales (quantité totale de substance d'essai introduite dans le dispositif d'inhalation, divisée par le volume d'air),

d) le cas échéant, nature du véhicule,

e) concentrations réelles dans la zone de respiration,

f) dimensions médianes des particules (si nécessaire),

— réponse toxique par sexe et concentration,

— moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,

— effets toxiques ou autres, niveau n'entraînant aucun effet,

— moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,

— quantité de nourriture et poids corporel,

— examens hématologiques pratiqués et résultats complets,

- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets,
- résultats d'autopsies,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. **Évaluation et interprétation**

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. **RÉFÉRENCES**

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 9. TOXICITÉ SUBAIGUË — ADMINISTRATION CUTANÉE**1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

La substance d'essai est appliquée quotidiennement par voie cutanée, en doses croissantes à plusieurs lots d'essai, à raison d'une dose par lot, durant une période de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés chaque jour afin de déceler les symptômes de toxicité. Les animaux qui meurent pendant l'expérience sont autopsiés, ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode**1.6.1. Préparations**

Les animaux sont maintenus dans les conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, les jeunes animaux sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins. Peu de temps avant l'essai, on tond la fourrure de la région dorsale des animaux. On peut avoir recours au rasage mais dans ce cas l'opération doit être effectuée environ 24 heures avant l'épreuve. Pendant la tonte ou le rasage, il faut veiller à éviter toute lésion de la peau. La surface à dégager pour l'application de la substance à tester ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en compte pour décider de la zone à dégager et des dimensions de la surface à traiter. Lorsque l'essai porte sur des substances solides qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées, la substance à tester doit être humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié de manière à assurer un bon contact avec la peau. Les substances liquides sont généralement utilisées à l'état non dilué. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours sur 7.

1.6.2. Conditions expérimentales**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Le rat, le lapin ou le cochon d'Inde adultes peuvent être utilisés. On peut aussi utiliser d'autres espèces mais il faut alors en justifier l'utilisation. Au commencement de l'expérience, la différence de poids entre les animaux ne doit pas dépasser $\pm 20\%$ de la valeur moyenne.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (5 femelles et 5 mâles), à la peau saine, doivent être utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non gravides. Si l'on prévoit de sacrifier certains animaux en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter les animaux qu'il est prévu de sacrifier avant la fin de l'expérience. De plus, un groupe satellite de 10 animaux (5 animaux par sexe) peut être traité avec le niveau de dose le plus élevé pendant 28 jours et faire l'objet d'une observation quant à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive des effets toxiques durant les 14 jours qui suivent le traitement.

1.6.2.3. Doses

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin et, le cas échéant, un lot témoin pour le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance d'essai doit être appliquée chaque jour au même moment et les doses doivent faire l'objet d'une adaptation hebdomadaire ou bihebdomadaire afin de conserver un niveau de dose constant en rapport avec le poids corporel des animaux. À l'exception des substances d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même façon que les sujets des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter le dosage, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions que pour les lots traités et la dose reçue correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit produire des effets toxiques n'entraînant pas (ou rarement) la mort. La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsqu'on dispose d'informations concernant l'exposition de l'homme, la dose la plus faible ne doit pas dépasser cette valeur. Dans les conditions idéales, la dose intermédiaire doit produire des effets toxiques minimaux observables. Si l'on utilise plusieurs doses intermédiaires, celles-ci doivent être suffisamment espacées pour entraîner une gradation des effets toxiques. Dans les lots correspondant à des doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, l'incidence de la mortalité doit être faible afin de permettre une évaluation significative des résultats.

Si l'application de la substance d'essai provoque une grave irritation cutanée, les concentrations doivent être réduites; cela peut entraîner une diminution, voire une disparition, des autres effets toxiques à la dose la plus élevée. De plus, si les lésions cutanées sont très graves, il peut se révéler nécessaire d'arrêter l'expérience et de la recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. Essai de limite

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 milligrammes par kilogramme, ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, lorsque celle-ci est connue, n'a provoqué aucun effet toxique, on peut juger inutile de poursuivre l'expérience.

1.6.2.5. Période d'observation

Les animaux d'expérience doivent faire l'objet d'une observation quotidienne afin de déceler les symptômes de toxicité. Le moment de la mort ainsi que le moment auquel les symptômes de toxicité apparaissent et disparaissent doivent être consignés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai est administrée aux animaux idéalement 7 jours sur 7 pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous groupes satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la guérison ou la persistance des effets toxiques. La durée de l'exposition doit être au moins de 6 heures par jour. La substance d'essai doit être appliquée uniformément sur une surface représentant environ 10 % de la surface totale corporelle. Lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être moins importante mais la couche doit être aussi mince et aussi uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un carré de gaze et d'un sparadrap non irritant. La surface traitée doit, en outre, être convenablement couverte de

manière à maintenir en place le pansement de gaze et la substance d'essai et à éviter que les animaux puissent ingérer cette dernière. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée.

À l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer tout résidu de substance avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les symptômes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être enregistrés. L'observation quotidienne doit porter entre autres sur les modifications des poils et de la fourrure, des yeux et des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, des systèmes nerveux autonome et central ainsi que de l'activité somato-motrice et du comportement. Le poids des animaux doit être déterminé chaque semaine. Il est également recommandé de mesurer la consommation alimentaire chaque semaine. Il est nécessaire d'observer régulièrement les animaux afin de veiller à ce que ceux-ci ne soient pas perdus pour l'expérience pour des raisons telles que cannibalisme, autolyse des tissus ou erreur de mise en place. À l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants des lots non satellites sont autopsiés. Les animaux moribonds sont immédiatement retirés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de l'expérience sur tous les animaux (y compris ceux du lot témoin):

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, la numération des hématies et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;
2. déterminations biochimiques cliniques du sang comprenant au moins un critère concernant l'exploration des fonctions hépatiques et rénales: alanine aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) et aspartate aminotransférase (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo-oxaloacétique) du sérum, azote uréique, albumine, créatinine plasmatique, bilirubine totale et protéines sériques totales.

Les autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, le glucose, les lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine, l'activité cholinestérasique.

D'autres analyses biochimiques cliniques peuvent, si nécessaire, être effectuées pour approfondir l'étude des effets observés.

1.6.4. *Autopsie*

Tous les animaux soumis à l'essai doivent faire l'objet d'une autopsie générale. Le foie, les reins, les glandes surrénales et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Les organes et les tissus (c'est-à-dire la peau normale et traitée), le foie, les reins et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux présentant des lésions importantes ou des modifications volumétriques) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs.

1.6.5. *Examen histopathologique*

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le lot témoin, il faut pratiquer un examen histologique des organes et des tissus conservés. Les organes et les tissus présentant des lésions induites par la substance d'essai au niveau de dose le plus élevé doivent être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux du lot satellite doivent faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels des lésions ont été constatées dans les autres lots traités.

2. DONNÉES

Les données doivent être récapitulées dans un tableau, indiquant, pour chaque lot d'expérience, le nombre d'animaux au début de l'essai et le nombre d'animaux présentant chaque type de lésion.

Tous les résultats observés doivent être évalués au moyen d'une méthode statistique appropriée. Toute méthode statistique reconnue peut être utilisée.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants:

- données relatives aux animaux (espèce, souche, origine, milieu ambiant, régime alimentaire, etc.),
- conditions expérimentales,
- doses (véhicules compris, le cas échéant) et concentrations,
- niveau n'entraînant aucun effet, si possible,
- réponse toxique par sexe et par dose,
- moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience,
- effets toxiques ou autres,
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci,
- quantité de nourriture et poids corporel,
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets,
- épreuves biochimiques cliniques pratiquées et résultats complets,
- résultats d'autopsie,
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques,
- traitement statistique des résultats, si c'est possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 10. AUTRES EFFETS: MUTAGENÈSE

ÉPREUVE CYTOGÉNÉTIQUE *IN VITRO* SUR MAMMIFÈRE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principes de la méthode

L'épreuve cytogénétique *in vitro* est un essai de mutagénicité à court terme destinée à déceler des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules de mammifères en culture. Des cultures de lignées cellulaires établies, ainsi que des cultures de cellules primaires peuvent être utilisées. Après exposition aux substances d'essai en présence et en l'absence d'un mélange d'activation d'enzymes hépatiques (fraction postmitochondriale suppléée de cofacteurs), les cultures cellulaires sont traitées par un inhibiteur de fuseau mitotique tel que la colchicine afin d'accumuler les cellules en phase de mitose du type métaphasique (c-métaphase). Les cellules sont récoltées à des moments adéquats et on effectue des préparations chromosomiques. Les préparations sont colorées et les cellules en métaphase sont analysées pour déceler des aberrations chromosomiques.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparations

Les substances d'essai sont préparées en milieu de culture ou dissoutes dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules. On utilise des lignées cellulaires établies ou des cultures de cellules primaires, par exemple cellules de hamsters chinois et lymphocytes humains.

1.6.2. Conditions expérimentales

Nombre de cultures

Deux cultures au moins sont utilisées pour chaque point expérimental

Utilisation de témoins négatifs et positifs

Le solvant (lorsque le solvant n'est pas le milieu de culture ou l'eau), le mélange d'activation d'enzymes hépatiques, le mélange d'activation d'enzymes hépatiques avec le solvant ainsi que les témoins non traités sont utilisés comme témoins négatifs.

Un témoin positif est inclus dans chaque expérience; lorsque le mélange d'activation d'enzymes hépatiques est utilisé pour activer la substance à tester, il faut utiliser, comme témoin positif, une substance nécessitant une activation métabolique.

On utilise au moins trois doses de la substance à tester sur un intervalle d'un logarithme au moins, la dose la plus élevée réduisant l'activité mitotique d'environ 50 %.

Conditions de culture

Un milieu de culture et des conditions d'incubation (par exemple température, récipients de culture, concentrations en CO₂ et humidité) appropriés sont utilisés.

1.6.3. Mode opératoire

1.6.3.1. Préparation des cultures

Lignées cellulaires établies: les cellules sont obtenues à partir de cultures mères (par exemple par trypsination ou par détachement sélectif par agitation vigoureuse),ensemencées dans des récipients de culture à la densité adéquate et sont incubés à 37 °C.

Lymphocytes humains: du sang hépariné est ajouté au milieu de culture, contenant de la phyto-hémagglutinine, du sérum de fœtus de veau ainsi que des antibiotiques, et est incubé à 37 °C.

1.6.3.2. Traitement des cultures avec la substance d'essai

i) Traitement sans mélange d'activation d'enzymes hépatiques.

Tous les traitements doivent couvrir le temps d'un cycle cellulaire complet et les schémas de fixation doivent garantir l'analyse des premières mitoses postérieures au traitement des cellules traitées à différents stades de leur cycle. Lorsque le traitement ne couvre pas la longueur d'un cycle cellulaire complet, on choisit des temps de fixation multiples afin de prélever des échantillons de cellules qui se trouvaient à des stades différents du cycle cellulaire pendant le traitement, c'est-à-dire G₁, S et G₂.

La substance d'essai est ajoutée aux cultures de lignées cellulaires établies lorsque celles-ci se trouvent dans leur phase de croissance exponentielle. Les cultures de lymphocytes humains sont traitées alors qu'elles sont encore en état semi-synchrone. Si la substance d'essai modifie la durée du cycle cellulaire, il y a lieu de modifier en conséquence l'intervalle de fixation.

ii) Le mélange d'activation d'enzymes hépatiques utilisés pour le traitement de la substance d'essai doit être présent aussi longtemps que possible, sans exercer un effet toxique sur les cellules. Si, pour des raisons de toxicité, ce traitement ne couvre pas la durée d'un cycle cellulaire complet, on choisit des temps de fixation multiples afin de prélever des échantillons de cellules qui se trouvaient à des stades différents du cycle cellulaire au moment du traitement, c'est-à-dire G₁, S et G₂.

Récolte des cellules

Les cultures cellulaires sont traitées au moyen de l'inhibiteur de fuseau mitotique 1 à 2 heures avant leur récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément pour la préparation des chromosomes.

1.6.3.3. Préparation des chromosomes

La préparation des chromosomes comporte un traitement hypotonique des cellules, la fixation, l'étalement sur des lames et la coloration.

Analyses

Au moins 100 métaphases bien étalées par culture sont analysées pour déceler des aberrations chromosomiques. Les lames sont codées avant l'analyse.

Pour les lymphocytes humains, seules les métaphases contenant 46 centromères sont analysées. Dans les lignées cellulaires établies, seules les métaphases contenant ± 2 centromères du nombre modal sont analysées.

2. DONNÉES

Les données sont présentées sous la forme de tableaux. Les aberrations de type chromatidien (lacunes, cassures, échanges mutuels), les aberrations de type chromosomique (lacunes, cassures, chromosomes minutes, anneaux, dicentriques, polycentriques) et le nombre de métaphases anormales (lacunes comprises et exclues) sont enregistrés séparément pour toutes les cultures traitées ainsi que pour les cultures témoins.

Les données sont évaluées par des méthodes statistiques appropriées.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants:

- cellules utilisées,
- conditions expérimentales: composition du milieu, concentration en CO₂, température d'incubation, durée d'incubation, doses, moment du traitement, durée du traitement avec l'inhibiteur de fuseau mitotique et concentration de celui-ci, type du mélange d'activation d'enzymes hépatiques utilisé, témoins positifs et négatifs,
- nombre de cultures cellulaires,
- nombre de métaphases analysées (données indiquées séparément pour chaque culture),
- index mitotique,
- type et nombre d'aberrations indiqués séparément pour chaque culture traitée et témoin, nombre modal de chromosomes dans les lignées cellulaires établies utilisées,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 11. AUTRES EFFETS: MUTAGENÈSE

ÉPREUVE CYTOGÉNÉTIQUE *IN VIVO* SUR MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFÈRE, ANALYSE CHROMOSOMIQUE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

L'épreuve cytogénétique *in vivo* est un essai de mutagenicité à court terme destinée à détecter des aberrations chromosomiques structurales. Celles-ci sont généralement évaluées au cours de la première mitose consécutive au traitement. Avec les mutagènes chimiques, la plupart des aberrations induites sont de type chromatidique.

Dans cette méthode, on utilise la moelle osseuse de mammifères exposés, par des voies appropriées, aux substances d'essai et sacrifiés à des intervalles successifs. Avant d'être sacrifiés, les animaux sont traités au moyen de substances telles que la colchicine, empêchant la formation du fuseau, afin d'accumuler les cellules en phase de mitose du type métaphasique (c-métaphase). Des préparations de chromosomes sont effectuées à partir de cellules séchées à l'air, puis colorées; les métaphases sont ensuite analysées au microscope afin de détecter des aberrations chromosomiques.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparations

Les substances d'essai sont dissoutes dans une solution physiologique. S'il s'agit de substances insolubles, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés.

Des solutions de la substance d'essai fraîchement préparées sont utilisées. Si un véhicule est utilisé pour faciliter le dosage, il ne doit ni interférer avec la substance d'essai ni produire des effets toxiques.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Animaux d'expérience

On utilise des rongeurs tels que le rat, la souris ou le hamster chinois. De jeunes animaux adultes et sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Au moins 5 femelles et 5 mâles sont utilisés dans chaque lot expérimental et chaque lot témoin. Dix animaux seront donc sacrifiés par période et par groupe si le programme expérimental comporte plusieurs moments d'observations après le traitement.

1.6.2.3. Voie d'administration

En général, les substances d'essai ne doivent être administrées qu'une fois. En fonction des informations toxicologiques dont on dispose, un programme d'administration répétée peut être utilisé. Toutefois, il ne peut l'être que si la substance qui doit être soumise à l'essai n'a pas d'effet cytotoxique sur la moelle osseuse. L'administration se fait généralement par voie orale ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

1.6.2.4. Utilisation de témoins positifs et négatifs

Une substance qui est réputée produire des aberrations chromosomiques *in vivo* est utilisée comme témoin positif et un lot témoin négatif (solvant) est également inclus dans le plan de chaque expérience.

1.6.2.5. Doses

Pour le dossier de base, on utilise une dose de la substance d'essai, à savoir la dose maximale tolérée ou celle faisant apparaître certains signes de cytotoxicité, par exemple, une inhibition partielle de la mitose.

D'autres doses peuvent être utilisées, lorsqu'elles sont indiquées pour des raisons d'ordre scientifique.

Si l'essai sert de méthode de vérification, il y a lieu d'utiliser au moins deux doses supplémentaires.

1.6.3. Mode opératoire

L'essai peut être réalisé de deux manières:

- i) la substance d'essai est administrée une fois aux animaux à la dose maximale tolérée. Après le traitement, des échantillons sont prélevés à trois reprises. Le prélèvement central a lieu à 24 heures. Puisque la cinétique du cycle cellulaire peut être influencée par la substance d'essai, un prélèvement antérieur et un prélèvement postérieur sont réalisés à intervalles appropriés dans l'intervalle de 6 à 48 heures suivant l'administration de la substance. Lorsque des doses supplémentaires sont utilisées, il y a lieu de prélever les échantillons à la période de sensibilité maximale ou, si celle-ci n'est pas connue, 24 heures après le traitement;
- ii) si les données pharmaco-cinétiques et métaboliques indiquent un programme de traitement répété, un dosage répété peut être utilisé et les échantillons doivent être prélevés 6 et 24 heures après le dernier traitement.

Préparation de la moelle osseuse

Avant de sacrifier les animaux, on leur injecte, par voie intrapéritonéale, une dose appropriée d'inhibiteur de fuseau mitotique afin d'obtenir un nombre de cellules adéquat en c-métaphase. La moelle osseuse est prélevée, par rinçage à l'aide d'une solution isotonique, à partir des deux fémurs des animaux fraîchement sacrifiés. Après un traitement hypotonique approprié, les cellules sont fixées puis étalées sur des lames. Après séchage à l'air, les lames sont colorées.

Analyse

Les lames sont codées avant d'être analysées au microscope. Au moins 50 métaphases bien étalées comportant le nombre complet de centromères sont analysées par animal pour déceler des aberrations chromosomiques structurales. Les index mitotiques peuvent être en outre établis pour chaque animal.

2. DONNÉES

Les données sont présentées sous la forme de tableaux. Les aberrations de type chromatidien et isochromatidien (lacunes, cassures, réarrangements), et le nombre de métaphases anormales (lacunes comprises et exclues) ainsi que les index mitotiques (lorsqu'ils sont établis) sont enregistrés séparément pour tous les animaux traités ainsi que pour les animaux témoins. Les moyennes et les écarts types obtenus pour chaque lot traité ainsi que pour chaque lot témoin sont également enregistrés. Les données sont évaluées par des méthodes statistiques appropriées.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal

Le procès-verbal de l'épreuve doit contenir les renseignements suivants:

- espèce et souche des animaux utilisés: âge des animaux,
- nombre d'animaux de chaque sexe des lots d'expérience et des lots témoins,
- conditions expérimentales: description détaillée du programme de traitement et de prélèvement, doses, durée du traitement avec l'inhibiteur de fuseau mitotique et la concentration de ces substances,
- nombre de métaphases analysées par animal,
- index mitotiques (lorsqu'ils sont établis),
- type et nombre d'aberrations indiqués séparément pour chaque animal traité et chaque animal témoin,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 12. AUTRES EFFETS: MUTAGENÈSE

ÉPREUVE DU MICRONOYAU

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

L'épreuve du micronoyau est un essai *in vivo* à court terme sur mammifère destiné à détecter les lésions chromosomiques ou celles de l'appareil mitotique induites par des substances chimiques. Cet essai est basé sur une augmentation du nombre des micronoyaux dans les érythrocytes polychromatiques des animaux traités par rapport aux animaux témoins.

Les micronoyaux sont formés de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers abandonnés lors de la mitose. Lorsque les érythroblastés se transforment en érythrocytes, le noyau principal est expulsé tandis que le micronoyau peut être conservé dans le cytoplasme. Pour cet essai, on utilise de jeunes érythrocytes polychromatiques provenant de la moelle osseuse de mammifères de laboratoire ayant été exposés, par des voies appropriées, à des substances d'essai. Après extraction de la moelle osseuse, des frottis sont préparés et colorés. On compte au microscope le nombre de micronoyaux présents dans les érythrocytes polychromatiques et on établit le rapport entre érythrocytes polychromatiques et normochromatiques.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparations

Les substances à tester sont dissoutes dans une solution isotonique. S'il s'agit de substances insolubles, elles sont dissoutes ou mises en suspension dans des véhicules appropriés. Si un véhicule est utilisé, il ne doit ni interférer avec la substance d'essai ni produire des effets toxiques. Normalement, on utilise des solutions de la substance à tester fraîchement préparées.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Il est recommandé d'utiliser des souris mais d'autres mammifères peuvent être utilisés. De jeunes animaux adultes et sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins.

1.6.2.2. Nombre et sexe

On utilise au moins 5 femelles et 5 mâles par lot traité et par lot témoin.

Dix animaux doivent donc être sacrifiés par période et par lot si le programme expérimental comporte plusieurs moments d'observations après le traitement.

1.6.2.3. Voie d'administration

En général, les substances d'essai ne doivent être administrées qu'une fois. En fonction des informations toxicologiques dont on dispose, un programme de traitement répété peut être appliqué. Toutefois, il ne peut l'être que si la substance à tester n'a pas d'effet cytotoxique sur la moelle osseuse.

L'administration se fait généralement par voie orale ou par injection intrapéritonéale. D'autres voies d'administration peuvent être appropriées.

1.6.2.4. Utilisation de témoins négatifs et positifs

Des témoins positifs de même que des témoins négatifs (solvant) doivent être utilisés pour chaque expérience.

1.6.2.5. Doses

Pour le dossier de base, on utilise une dose de la substance d'essai, à savoir la dose maximale tolérée ou celle faisant apparaître certains signes de cytotoxicité, par exemple, une modification du rapport érythrocytes polychromatiques/érythrocytes normochromatiques.

D'autres doses peuvent être utilisées lorsqu'elles sont indiquées pour des raisons d'ordre scientifique.

Si l'essai sert de méthode de vérification, il y a lieu d'utiliser au moins deux doses supplémentaires.

1.6.3. Mode opératoire

L'essai peut être réalisé de deux manières:

- i) la substance à tester est administrée une fois aux animaux à la dose maximale tolérée. Les prélèvements d'échantillon doivent être effectués au moment correspondant à la sensibilité maximale de l'essai qui varie selon la substance d'essai. C'est pourquoi, lorsqu'on utilise la dose maximale, on prélève des échantillons de moelle osseuse à 3 reprises au moins, en commençant le traitement, puis à des intervalles appropriés sans toutefois aller au-delà de 72 heures.

Lorsque des doses supplémentaires sont utilisées, il convient de prélever les échantillons à la période de sensibilité maximale ou, si celle-ci n'est pas connue, 24 heures après le traitement;

- ii) si les données pharmaco-cinétiques et métaboliques indiquent un programme de traitement répété, un dosage répété peut être utilisé et les échantillons doivent être prélevés à 3 reprises au moins, au plus tôt 12 heures après le dernier traitement, puis à des intervalles appropriés sans toutefois aller au-delà de 72 heures.

Préparation de la moelle osseuse

La moelle osseuse est prélevée, par rinçage à l'aide de sérum de fœtus de veau, des deux fémurs des animaux fraîchement sacrifiés. Les cellules sont sédimentées par centrifugation et le surnageant est écarté. Des gouttes de la suspension cellulaire homogène sont déposées et étalées en frottis sur des lames. Après séchage à l'air, les lames sont colorées.

Analyse

Les lames sont codées avant d'être analysées au microscope. On recherche la présence de micronoyaux parmi au moins 1 000 érythrocytes polychromatiques par animal.

Le rapport entre érythrocytes normochromatiques et polychromatiques est déterminé, pour chaque animal, sur la base de 1 000 érythrocytes.

2. DONNÉES

Les données sont présentées sous la forme de tableaux. Le nombre des érythrocytes polychromatiques, le nombre d'érythrocytes polychromatiques comportant des micronoyaux ainsi que le pourcentage de cellules micronuclées sont enregistrés séparément pour chaque animal traité et chaque animal témoin, de même que le rapport entre érythrocytes normochromatiques et polychromatiques. Les moyennes et les écarts types sont également enregistrés pour chaque lot traité et chaque lot témoin. Les données sont évaluées par des méthodes statistiques appropriées.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- espèce et souche d'animaux utilisés, âge des animaux,
- nombre d'animaux de chaque sexe des lots traités et des lots témoins,
- conditions expérimentales: description détaillée des programmes de traitement et de prélèvement, doses, données relatives à la toxicité, témoins négatifs et positifs,
- critères de comptage des micronoyaux,
- relation dose-effet, si possible,
- évaluation statistique,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 13. AUTRES EFFETS: MUTAGENÈSE

ESSAIS DE MUTATION RÉVERSE SUR *ESCHERICHIA COLI*

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voie introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

Le système de réversion au tryptophane d'*E. coli* (*trp*) est un essai microbien permettant de mesurer la réversion *trp*⁻ → *trp*⁺ due à des substances chimiques responsables de substitution de base au niveau du génome de l'organisme.

Les bactéries sont exposées aux substances d'essai avec et sans activation métabolique. Après une période d'incubation adéquate sur milieu minimale, on compte les colonies révertantes et on compare le nombre obtenu à celui des révertants spontanés observés dans une culture témoin non traitée et/ou en présence du solvant.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

L'essai peut être réalisé par les méthodes suivantes:

- i) méthode de pré-incubation;
- ii) méthode d'incorporation directe où les bactéries et la substance d'essai sont mélangées à la gélose de recouvrement et versées à la surface d'une boîte de gélose sélective.

1.6.1. Préparations

1.6.1.1. Bactéries

Les bactéries sont cultivées à 37 °C jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance. La densité cellulaire approximative doit être de 10⁸ - 10⁹ cellules par millilitre.

1.6.1.2. Activation métabolique

Les bactéries doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un mélange d'activation adéquat d'enzymes hépatiques de mammifère (fraction postmitochondriale suppléée de cofacteurs) préparé à partir de souris ou de rats prétraités avec des inducteurs enzymatiques.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Souches d'expérience

Trois souches, à savoir WP2, WP2 uvr A et WP2 uvr A pKM 101, doivent être utilisées. Il y a lieu d'utiliser des méthodes reconnues pour la préparation et la conservation des cultures. Les exigences de la croissance et l'identité génétique des souches, leur sensibilité aux rayons UV ou à la mitomycine C ainsi que la résistance à l'ampicilline dans la souche WP2 uvr A pKM 101 doivent être vérifiées. Les souches doivent également produire des révertants spontanés dans les gammes de fréquence escomptées.

1.6.2.2. Milieux

On utilise un milieu approprié à l'expression et la sélection des mutants ainsi qu'une gélose de recouvrement adéquate.

1.6.2.3. Utilisation de témoins négatifs et positifs

On doit utiliser en parallèle des essais avec des témoins non traités et des témoins en présence de solvants. Des témoins positifs doivent également être réalisés dans les deux buts suivants :

- i) confirmer la sensibilité des souches bactériennes. Le méthyleméthane sulphonate, l'oxyde de 4-nitroquinoléine ou l'éthylnitrosourée peuvent être utilisés comme témoins positifs pour les essais sans activation métabolique ;
- ii) garantir l'activité du système métabolisant adéquat. Le 2-aminoanthracène constitue un témoin positif de l'activité d'un (du) système métabolisant pour toutes les souches. Il convient, si possible, d'utiliser un témoin positif appartenant à la même classe chimique que la substance soumise à l'essai.

1.6.2.4. Quantité de substance à tester par plaque

Au moins 5 quantités différentes de la substance d'essai doivent être essayées avec des écarts demi-logarithmiques entre boîtes. Les substances sont soumises à l'essai jusqu'à ce que les limites de solubilité ou de toxicité soient atteintes. La toxicité est mise en évidence par une réduction du nombre de révertants spontanés, un éclaircissement du tapis de fond, ou par le taux de survie des cultures traitées. Les substances chimiques non toxiques doivent être testées jusqu'à 5 milligrammes par boîte avant que l'on puisse considérer la substance d'essai comme négative.

1.6.2.5. Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées pendant 48 à 72 heures à 37 °C.

1.6.3. Mode opératoire

Dans la méthode d'incorporation directe sur boîte sans activation enzymatique, on ajoute la substance d'essai et 0,1 millilitre de culture bactérienne fraîche à 2,0 millilitre de gélose de recouvrement. Pour les essais avec activation métabolique, on ajoute à la gélose 0,5 millilitre de mélange d'activation d'enzymes hépatiques contenant une quantité adéquate de fraction postmitochondriale, après addition de la substance d'essai et des bactéries. Le contenu de chaque tube est mélangé et versé à la surface d'une boîte de gélose sélective. La gélose de recouvrement doit se solidifier et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 à 72 heures. Au terme de la période d'incubation, on compte les colonies révertantes par boîte.

Pour la méthode de préincubation, un mélange contenant la substance d'essai, 0,1 millilitre de culture bactérienne fraîche et une quantité adéquate de mélange d'activation d'enzymes hépatiques ou la même quantité de solution tampon sont préincubés avant addition de 2,0 millilitres de gélose de recouvrement. Le reste du mode opératoire est identique à celui utilisé pour la méthode d'incorporation directe sur boîte.

Toutes les boîtes préparées par ces deux méthodes le sont au moins en trois exemplaires.

2. DONNÉES

Le nombre de colonies révertantes par boîte est indiqué pour les séries témoins et les séries traitées. Les dénombrements par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et les écarts types doivent être indiqués pour la substance testée et les témoins.

Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante.

Les données doivent être évaluées par des méthodes statistiques adéquates.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- bactéries, souche utilisée,
- conditions expérimentales: doses, toxicité, composition du milieu, méthodes de traitement (préincubation, incubation), mélange d'activation d'enzymes hépatiques, substance de référence, témoins négatifs,
- dénombrement par boîte, nombre moyen de colonies révertantes par boîte, écart type, relation dose/effet, si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

B. 14. AUTRES EFFETS: MUTAGENÈSE

ESSAIS DE MUTATION RÉVERSE SUR *SALMONELLA THYPHIMURIUM*

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. Définition

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. Substances de référence

Néant.

1.4. Principe de la méthode

Le système de réversion à l'histidine (*his*) de *Salmonella typhimurium* est un essai microbien permettant de mesurer la réversion *his*⁻ — *his*⁺ induite par des substances chimiques responsables de substitutions de base ou de mutations déplaçant le cadre de lecture au niveau du génome de l'organisme.

Les bactéries sont exposées à la substance d'essai avec et sans activation métabolique et versées à la surface d'un milieu minimal. Après une période d'incubation adéquate, on compte le nombre de colonies révertantes et on le compare à celui des révertants spontanés observés dans une culture témoin non traitée et/ou en présence du solvant.

1.5. Critère de qualité

Néant.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Préparations

1.6.1.1. Bactéries

Des cultures fraîches de bactéries sont cultivées à 37 °C jusqu'à la fin de la phase exponentielle ou jusqu'au début de la phase stationnaire de croissance. La densité cellulaire approximative doit être de 10⁸—10⁹ cellules par millilitre.

1.6.1.2. Activation métabolique

Les bactéries doivent être exposées à la substance d'essai en présence et en l'absence d'un mélange d'activation adéquat d'enzymes hépatiques de mammifère (fraction postmitochondriale suppléée de cofacteurs) préparé à partir de souris ou de rats prétraités avec des inducteurs enzymatiques.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Souches d'expérience

Au moins quatre souches TA 1535, TA 1537, TA 98 et TA 100 doivent être utilisées; d'autres souches, telles que TA 1538, peuvent être utilisées en supplément.

Il y a lieu d'utiliser des méthodes reconnues pour la préparation et la conservation des cultures. Les exigences de la croissance et l'identité génétique des souches, leur sensibilité aux rayons UV et au cristal violet ainsi que leur résistance à l'ampicilline doivent être vérifiées. Les souches doivent également produire des révertants spontanés dans les gammes de fréquence escomptées.

1.6.2.2. Milieux

Un milieu sélectif approprié est utilisé ainsi qu'une gélose de recouvrement adéquate.

1.6.2.3. Utilisation de témoins négatifs et positifs

On doit utiliser en parallèle des témoins non traités et des témoins en présence de solvants.

Des témoins positifs doivent également être utilisés dans les deux buts suivants :

i) confirmer la sensibilité des souches bactériennes.

Les composés ci-après peuvent être utilisés pour les essais sans activation métabolique

<i>Avec</i>	<i>Souches réversion</i>
TA 1535, TA 100	Azide de sodium
TA 1538, TA 98	2-nitrofluorène
TA 1537	9-aminoacridine ;

ii) garantir l'activité du système métabolisant adéquat. Un témoin positif de l'activité d'un système métabolisant est la 2-aminoanthracène pour toutes les souches. Il faut, si possible, utiliser un témoin positif appartenant à la même classe chimique que la substance d'essai.

1.6.2.4. Quantité de substance d'essai par boîte

Au moins 5 quantités différentes de substances doivent être soumises à l'essai avec des écarts demi-logarithmiques entre boîtes. Les substances sont soumises à l'essai jusqu'à ce que les limites de solubilité ou de toxicité soient atteintes. La toxicité est mise en évidence par une réduction du nombre de révertants spontanés, un éclaircissement du tapis de fond, ou par le taux de survie des cultures traitées. Les substances chimiques non toxiques doivent être soumises à l'essai jusqu'à 5 milligrammes par boîte avant que l'on puisse considérer la substance d'essai comme négative.

1.6.2.5. Conditions d'incubation

Les boîtes sont incubées pendant 48 à 72 heures à 37 °C.

1.6.3. Mode opératoire

Pour la méthode d'incorporation directe sur boîte sans activation enzymatique, on ajoute la substance d'essai et 0,1 millilitre de culture bactérienne fraîche à 2,0 millilitres de gélose de recouvrement. Pour les essais avec activation métabolique, on ajoute à la gélose 0,5 millilitre de mélange d'activation d'enzymes hépatiques contenant une quantité adéquate de fraction postmitochondriale après addition de la substance d'essai et des bactéries. Les contenus de chaque tube sont mélangés et versés à la surface d'une boîte de gélose sélective. La gélose doit se solidifier et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 à 72 heures. Au terme de la période d'incubation, on compte les colonies révertantes par boîte.

Pour la méthode de préincubation, un mélange contenant la substance d'essai, 0,1 millilitre de culture bactérienne fraîche et une quantité adéquate de mélange d'activation d'enzymes hépatiques ou la même quantité de solution tampon sont préincubés avant addition de 2,0 millilitre de gélose de recouvrement. Le reste du mode opératoire est identique à celui utilisé pour la méthode d'incorporation directe sur boîte.

Toutes les boîtes préparées par ces deux méthodes le sont au moins en trois exemplaires.

2. DONNÉES

Le nombre de colonies révertantes par boîte est indiqué pour les séries témoins et les séries traitées. Les dénombrements par boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et les écarts types doivent être indiqués pour la substance d'essai et les témoins. Tous les résultats sont confirmés au cours d'une expérience indépendante. Les données doivent être évaluées par des méthodes statistiques adéquates.

3. RÉSULTATS**3.1. Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai devra, si possible, contenir les renseignements suivants :

- bactéries, souche utilisée,
- conditions expérimentales : doses, toxicité, composition du milieu, méthodes de traitement (préincubation, incubation), mélange d'activation d'enzymes hépatiques, substances de référence, témoins négatifs,
- dénombrement par boîte, nombre moyen de colonies révertantes par boîte, écart type, relation dose/effet si possible,
- discussion des résultats,
- interprétation des résultats.

3.2. Évaluation et interprétation

Voir introduction générale, partie B (point C).

4. RÉFÉRENCES

Voir introduction générale, partie B (point D).

PARTIE C: MÉTHODES DE DÉTERMINATION DE L'ÉCOTOXICITÉ**C. 1. TOXICITÉ AIGUË POUR LES POISSONS****1. MÉTHODE****1.1. Introduction**

Il est souhaitable de disposer, dans toute la mesure du possible, d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance d'essai, en vue du choix de la méthode d'essai la plus appropriée (en statique, en semi-statique, ou en dynamique), permettant d'assurer des concentrations constantes satisfaisantes de la substance d'essai pendant la période d'essai.

Les autres informations nécessaires, par exemple la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage d'impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs ainsi que le coefficient de partage n-octanol/eau devraient être prises en considération, lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. Définition et unités

La toxicité aiguë est l'effet défavorable discernable induit dans un organisme pendant une courte durée (jours) d'exposition à une substance donnée.

Dans le présent essai, la toxicité aiguë est exprimée comme la concentration létale médiane (CL_{50}), c'est-à-dire la concentration qui dans l'eau est responsable de la mort de 50 % d'un lot de poissons soumis aux essais pendant une période d'exposition continue à indiquer. Les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par volume (mg/l) et également en poids par poids (partie par million).

1.3. Substances de référence

On pourra soumettre aux essais une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai du laboratoire, la réponse de l'espèce soumise à essai n'a pas varié de façon significative.

Aucune substance de référence n'est indiquée pour cet essai.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Les poissons sont exposés à/aux substance(s) d'essai ajoutées à de l'eau, dans un intervalle de concentrations donné, pendant une période minimale de 48 heures, mais de préférence 96 heures. Les mortalités sont consignées au moins toutes les 24 heures, et les concentrations responsables de la mort de 50 % des poissons (CL_{50}) sont calculées si possible à chaque observation.

1.5. Critères de qualité

La mortalité des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène doit être supérieure à 60 % de la saturation pendant toute la durée de l'essai.

L'analyse, les propriétés chimiques ou le système d'essai utilisé devraient faire apparaître que la concentration de la substance soumise à essai s'est maintenue de façon satisfaisante (par exemple dans les limites de 80 % de la concentration initiale, pendant la durée de l'essai).

1.6. Description de la méthode d'essai

Trois types de systèmes peuvent être utilisés.

Essai en statique:

essai de toxicité pratiqué sur des organismes aquatiques, au cours duquel il n'intervient aucun renouvellement de la solution d'essai (les solutions restent inchangées pendant toute la durée d'essai).

Essai en semi-statique:

essai sans renouvellement en continu de la solution, mais avec un renouvellement périodique si la période d'essai se prolonge (par exemple toutes les 24 heures).

Essai en dynamique:

essai de toxicité au cours duquel l'eau est constamment renouvelée dans les récipients d'essai, le produit chimique soumis à essai étant transporté par l'eau utilisée pour renouveler le milieu d'épreuve.

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substances d'essai

Les solutions mères de concentrations requises sont préparées par dissolution de la substance dans de l'eau déionisée, ou dans de l'eau, conformément au point 1.6.1.2.

Les solutions mères de substances à faible hydrosolubilité peuvent être préparées par dispersion ultrasonique ou, si nécessaire, en recourant à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants. Lorsqu'on utilise ce type de produit auxiliaire, les poissons témoins doivent être exposés à la même concentration en produit auxiliaire qu'à celle présente dans la concentration maximale de la substance d'essai. La concentration de ces produits auxiliaires ne devrait pas dépasser 0,1 gramme par litre.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si l'on procède à un essai à concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

L'essai doit être effectué sans ajustement du pH. S'il apparaît un changement significatif du pH, il est souhaitable de répéter l'essai avec ajustement du pH et d'en consigner les résultats. Dès lors, la valeur du pH de la solution mère doit être ajustée à la valeur du pH de l'eau de dilution à moins que des raisons particulières ne s'y opposent. HCl et NaOH sont préférés. Cet ajustement doit être effectué de manière à ce que la concentration de la substance d'essai dans la solution mère n'est pas significativement modifiée. Si l'ajustement entraîne une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, lors de l'essai suivant, l'observation doit être consignée.

1.6.1.2. Eaux pour l'élevage et la dilution

On pourra utiliser de l'eau potable (non contaminée par des concentrations dangereuses de chlore, de métaux lourds ou d'autres substances), de l'eau naturelle de bonne qualité ou de l'eau «reconstituée» (voir appendice 1). On préférera les eaux dont la dureté totale est comprise entre 50 et 250 milligrammes par litre (en CaCO₃), avec un pH de 6,0-8,5.

1.6.2. Appareillage

L'appareillage doit être en matériau chimiquement inerte:

- système de dilution automatique (pour l'essai en dynamique),
- dispositif de mesure de l'oxygène,
- équipement pour la détermination de la dureté de l'eau,
- appareillage approprié pour le contrôle de la température,
- pH-mètre.

1.6.3. *Poissons soumis à essai*

On utilisera une ou plusieurs espèces, le choix étant laissé au laboratoire qui procède à l'essai.

Il est recommandé que l'espèce utilisée soit choisie sur la base de critères pratiques déterminants, tels que: disponibilité immédiate pendant toute l'année, facilité d'entretien, aptitude à l'essai, sensibilité relative, et tous facteurs significatifs économiques, biologiques ou écologiques. Le poisson doit être en bonne santé et exempt de toute malformation apparente.

Les espèces de poisson recommandées pour l'essai sont indiquées à l'appendice 2.

1.6.3.1. *Élevage*

Les poissons soumis à essai doivent provenir de préférence d'un seul et même lot, dont les individus ont la même longueur et le même âge. Ils doivent être conservés pendant au moins 12 jours dans les conditions suivantes:

— *réipients:*

des volumes de 300 litres au moins pour les poissons d'eau froide et de 100 litres au moins pour les poissons d'eau chaude sont souhaitables,

— *charge:*

variable selon le système utilisé (recirculation ou en dynamique) et l'espèce de poisson,

— *eau:*

voir point 1.6.1.2,

— *lumière:*

photopériode de 12 à 16 heures par jour,

— *concentration en oxygène dissous:*

au moins 80 % de la saturation,

— *alimentation:*

quotidiennement ou 3 fois par semaine, avec arrêt 24 heures avant le début de l'essai.

1.6.3.2. *Mortalité*

Après une période d'adaptation de 48 heures, enregistrer les mortalités. Juger de la qualité du lot selon les critères suivants:

— mortalité en 7 jours supérieure à 10 % de la population: rejet de l'ensemble du lot,

— mortalité en 7 jours comprise entre 5 et 10 % de la population: prolonger la période d'observation pendant 7 jours. Si l'on ne constate aucun autre cas de mortalité, le lot est acceptable, sinon il doit être refusé,

— mortalité en 7 jours inférieure à 5 % de la population: acceptation du lot.

1.6.4. *Adaptation*

Les poissons doivent être maintenus pendant au moins 7 jours avant leur utilisation dans les conditions de l'essai (eau et température).

1.6.5. *Mode opératoire*

Avant l'essai définitif, on pourra procéder à un essai visant à déterminer l'intervalle de concentrations efficaces. Cet essai fournira des informations sur l'intervalle de concentrations à utiliser lors de l'essai définitif.

Procéder à un essai témoin, c'est-à-dire sans substance d'essai, en utilisant le cas échéant le produit auxiliaire. Cet essai témoin s'ajoute à la série des essais proprement dits.

Les concentrations ne doivent pas diminuer de plus de 20 % durant la période d'essai. En fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance d'essai, on choisira une méthode en statique, en semi-statique ou en dynamique.

Le poisson est exposé à la substance d'essai dans les conditions suivantes :

- durée:
au moins 48 heures, de préférence 96 heures,
- nombre d'organismes:
au moins 10 par concentration,
- récipients:
d'une capacité appropriée, en fonction de la charge recommandée,
- charge biologique:
charge maximale recommandée pour l'essai en statique et en semi-statique: 1,0 gramme par litre;
pour les essais en dynamique, une charge plus élevée peut être acceptable,
- concentration d'essai:
un témoin, au moins cinq concentrations d'essai différentes d'un facteur constant n'excédant pas 1,8
et comprises dans l'intervalle de mortalité de 0 % à 100 %,
- eau:
voir point 1.6.1.2,
- lumière:
photopériode de 12 à 16 heures par jour,
- température:
convenant à l'espèce choisie (voir ci-avant), mais à ± 1 °C près, quel que soit le système d'essai,
- concentration en oxygène dissous:
au moins 60 % de la saturation;
- nourriture:
néant.

Les poissons sont examinés pendant les 2 à 4 premières heures et au moins à intervalles de 24 heures. Ils sont considérés comme morts si le fait de toucher le pédoncule caudal ne produit aucune réaction et si aucun mouvement respiratoire n'est visible. Les poissons morts sont éliminés à chaque observation et les mortalités enregistrées.

Les anomalies visibles (par exemple: perte d'équilibre, nage, respiration, pigmentation, etc.) seront consignées.

Les mesures du pH, de l'oxygène dissous et de la température seront effectuées quotidiennement.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Reporter sur papier log-Probit les pourcentages de mortalité pour chaque période d'exposition recommandée, en fonction des concentrations. Relier les points obtenus et noter la concentration correspondant à 50 % de réponse (voir figure à l'appendice 3).

On obtient ainsi la CL_{50} pour la période d'exposition appropriée.

Si les données sont adéquates, la concentration létale médiane (CL_{50}) et ses limites de confiance ($p = 0,05$) peuvent être estimées en utilisant une méthode classique.

La valeur de la CL_{50} devrait être arrondie à un ou au maximum deux chiffres significatifs.

Dans le cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour permettre le calcul de la CL_{50} , il suffira de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 1,8 ne donnent que 0 ou 100 % de mortalité, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CL_{50} .

Si l'on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance d'essai ne peut pas être maintenue, cette observation doit être mentionnée et on interprétera avec prudence les résultats.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible :

- des informations sur l'organisme soumis à essai (nom scientifique, souche, fournisseur, pré-traitement éventuel, taille et nombre utilisés pour chaque concentration d'essai),
- la liste des concentrations utilisées et toutes informations disponibles sur la stabilité de la substance d'essai en solution à ces concentrations,
- la description de l'équipement d'essai,
- si on procède à des analyses chimiques, les méthodes utilisées et les résultats obtenus,
- l'origine de l'eau de dilution et ses principales caractéristiques (pH, dureté, température),
- éventuellement, les concentrations en produits auxiliaires,
- dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, la méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai,
- les motifs du choix et les détails de la méthode d'essai utilisée (par exemple : durée de l'essai, système statique, semi-statique, dynamique, taux de renouvellement, aération ou non, charge en poisson, etc.),
- des informations concernant l'éclairage,
- la concentration maximale testée ne causant pas de mortalité pendant la durée de l'essai,
- la concentration minimale testée causant 100 % de mortalité pendant la durée de l'essai,
- la mortalité cumulée pour chaque concentration et pour l'essai témoin (contrôle à l'aide du produit auxiliaire, le cas échéant) aux temps d'observation recommandés,
- les valeurs de la CL_{50} à chacun des temps d'observation recommandés (limites de confiance à 95 % si possible),
- les méthodes statistiques utilisées pour déterminer les valeurs de la CL_{50} ,
- la représentation graphique des pourcentages de mortalité en fonction des concentrations à la fin de l'essai,
- la pente de la courbe et ses limites de confiance de 95 %,
- la concentration de l'oxygène dissous, le pH et la température des solutions d'essai toutes les 24 heures,
- si une substance de référence est utilisée, son nom et les résultats obtenus,
- les critères de qualité doivent être respectés.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OCDE, Paris 1981, Test Guidelines 203, Decision of the Council C (81) 30, Final.

*Appendice 1***Eau reconstituée***Exemple d'eau de dilution appropriée*

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau devrait être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau déionisée d'une conductivité inférieure à $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Solutions mères

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (chlorure de calcium dihydrate): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre.	11,76 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydrate): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre.	4,93 g
NaHCO ₃ (hydrogénocarbonate de sodium): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre.	2,59 g
KCl (chlorure de potassium): dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre.	0,23 g

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 millilitres de chacune des quatre solutions mères et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous.

Le pH doit être de $7,9 \pm 0,3$.

Si nécessaire, l'ajuster avec NaOH (hydroxyde de sodium) ou HCl (acide chlorhydrique).

L'eau de dilution ainsi préparée est laissée au repos pendant environ 12 heures et ne doit pas être aérée ultérieurement.

La somme des ions Ca/Mg dans cette solution est égale à 2,5 mmol/l. Le rapport des ions Ca:Mg est de 4:1, celui des ions Na:K de 10:1. L'alcalinité totale de cette solution est égale à 0,8 mmol/l.

Les déviations éventuelles dans la préparation de l'eau de dilution ne doivent pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

Appendice 2

Espèces de poisson recommandées pour l'essai

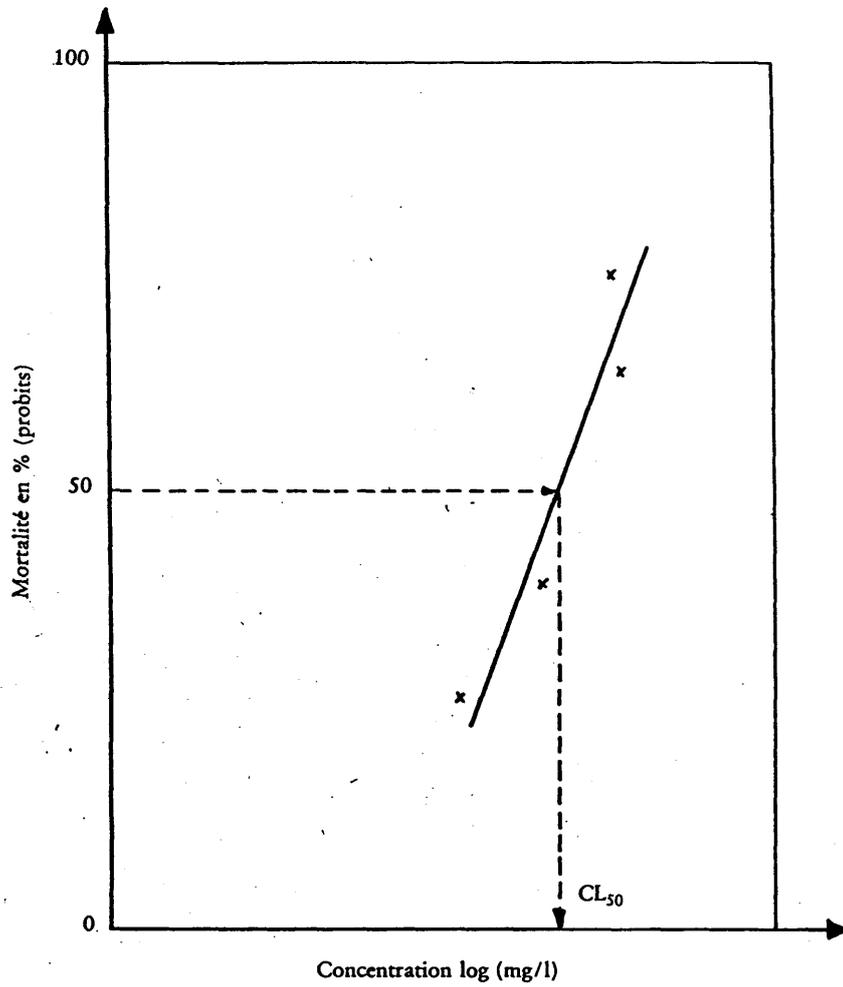
Espèce recommandée	Intervalle des températures d'essai recommandé (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal soumis à l'essai (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Poisson zèbre	20 à 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) Fathead minnow	20 à 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpe commune	20 à 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Schlegel 1850) Killifish	20 à 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 à 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Linnaeus 1758) Bluegill	20 à 24	5,0 ± 2,0
<i>Salmo gairdneri</i> (Teleostei, Salmonidae) (Richardson 1836) Truite arc-en-ciel	13 à 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Ide mélanote	20 à 24	6,0 ± 2,0

Approvisionnement

Les poissons mentionnés ci-avant sont faciles à élever et/ou largement disponibles pendant toute l'année. Ils peuvent se reproduire et se développer soit dans des exploitations piscicoles soit en laboratoire, dans des conditions sanitaires contrôlées. L'animal soumis à essai doit être sain et d'origine connue. Ces poissons sont disponibles presque partout dans le monde.

Appendice 3

Exemple de courbe pourcentage de mortalité/concentration

Exemple de détermination de la CL_{50} sur papier log-probit

Appendice 4

Exemples de méthodes standardisées

- (1) OECD, Paris, 1981, test guideline 203, Decision of the Council C (81) 30, Final.
- (2) ISO/TC/147/SC 5/WG/3 — Draft proposal for screening chemicals and products for acute toxicity to fish using a static, semi-static or flow-through method — Document 7346/I, II, III, 1980/06/15 ISO/DP.
- (3) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungs-methoden — Part II 1974.
- (4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen. 38 412 (L1) und L (15).
- (5) AFNOR. Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Brachydanio rerio*. T90—303.
- (6) JIS K 0102. Acute toxicity test for fish.
- (7) Degradability, Ecotoxicity and Bioaccumulation. The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment, Volume I and II, Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands 1980.
- (8) Environmental Protection Agency 1975. Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms. Ecological Research Series EPA-660-75-009.
- (9) Environmental Protection Agency. January 1978. Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012.
- (10) Environmental Protection Agency: Toxic Substance Control, March 16 1979, Part IV.
- (11) Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition 1975 APHA-AWWA-WPCF.
- (12) Commission of the European Communities. Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. CEE Study D.8368, 22 March 1979.
- (13) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for Evaluating dose Effects Experiments, J. Pharm. Exp. Therap., Vol. 96, 1949, p. 99.

C. 2. TOXICITÉ AIGUË POUR LES DAPHNIES

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Il est souhaitable d'avoir dans toute la mesure du possible des informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance, avant de commencer l'essai.

Des informations supplémentaires (par exemple: la formule développée, la pureté en pourcentage, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et le nombre des additifs et le coefficient de partage n-octanol/eau) devraient être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. Définitions et unités

La demande dans la directive relative à la CL_{50} concernant la daphnie se trouve remplie par la détermination de la CE_{50} telle qu'elle est décrite dans la présente méthode d'essai.

Dans le présent essai, la toxicité aiguë est exprimée par la concentration médiane effective (CE_{50}) d'immobilisation. Cela correspond à la concentration (en valeur initiale) qui inhibe la mobilité de 50 % des daphnies d'un lot soumis à l'essai pendant une période d'exposition de 24 heures. La CE_{50} — 48 heures peut également être déterminée, si possible. Toutes les concentrations en substances d'essai sont exprimées en poids par volume (mg/l) et également en poids par poids (partie par million).

Immobilisation

Les organismes qui sont incapables de se déplacer dans les 15 secondes qui suivent une légère agitation du récipient sont considérés comme immobilisés.

Les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par poids (partie par million).

1.3. Substances de référence

Une substance de référence peut être soumise à essai pour démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la sensibilité de la souche utilisée pour l'essai n'est pas sensiblement modifiée.

Aucune substance de référence n'est indiquée pour cet essai.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Les daphnies sont exposées pendant 24 heures à la substance d'essai diluée dans l'eau à différentes concentrations; si nécessaire, la durée d'exposition peut être prolongée jusqu'à 48 heures.

Dans des conditions d'essai identiques, pour une gamme de concentrations efficaces, des concentrations différentes en substances d'essai exercent des effets différents sur la mobilité des daphnies. En conséquence, en fin d'essai à chaque concentration correspond un pourcentage différent d'immobilisation des daphnies.

Les concentrations provoquant de 0 à 100 % d'immobilisations sont déterminées directement par l'observation, tandis que la CE_{50} — 24 heures (tout comme la CE_{50} — 48 heures) est déterminée, si possible, par calcul.

Pour cette méthode, on utilise un système statique, sans renouvellement des solutions d'essai pendant la période d'exposition.

1.5. Critères de qualité

L'immobilisation des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène ne doit pas être inférieure à 2 milligrammes par litre à la fin de l'essai.

Les daphnies soumises à l'essai ne devraient pas être entraînées à la surface de l'eau, du moins dans le témoin.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substances d'essai

Des solutions mères de concentrations requises sont préparées en dissolvant la substance dans de l'eau déionisée ou dans de l'eau répondant aux conditions fixées au point 1.6.1.2.

Pour les substances à faible hydrosolubilité, les solutions mères peuvent être préparées par dispersion ultrasonique ou, si nécessaire, en utilisant des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants. Si on fait appel à ces substances, les daphnies témoins doivent être exposées à la même concentration en produit auxiliaire qu'à celle présente dans la concentration maximale de la substance d'essai. La concentration de ces produits auxiliaires ne doit pas dépasser 0,1 gramme par litre.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si les essais portent sur des concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

L'essai doit être effectué sans ajustement du pH. En cas de modifications significatives du pH, il est souhaitable de répéter l'essai en ajustant le pH et d'enregistrer les résultats. Dans ce cas, la valeur du pH de la solution mère doit être adaptée à la valeur du pH de l'eau de dilution, à moins qu'il y ait des raisons particulières de ne pas agir ainsi. On préfère utiliser à cet effet HCl ou NaOH. Cet ajustement du pH doit être effectué de manière à ne pas modifier sensiblement la concentration en substance d'essai de la solution. Si l'ajustement provoquait une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, cet essai ne devrait pas être poursuivi sans consigner ces observations au procès-verbal.

1.6.1.2. Eaux pour l'élevage et la dilution

Toute eau naturelle ou reconstituée convenant à l'élevage des daphnies (voir appendice) peut être utilisée pour cet essai.

Afin d'éviter de devoir procéder à des adaptations avant essai, il est recommandé d'utiliser une eau d'élevage identique à celle utilisée pour l'essai.

1.6.2. Appareillage

On utilisera le matériel courant de laboratoire. Le matériel destiné à être en contact avec les solutions d'essai doit de préférence être en verre:

- appareil pour mesurer l'oxygène (avec micro-électrode ou tout autre équipement convenant pour mesurer l'oxygène dans des échantillons de petit volume),
- appareil convenant pour le contrôle de la température,
- pH-mètre.
- appareil permettant de déterminer la dureté de l'eau.

1.6.3. Organisme soumis à l'essai

Daphnia magna ou *Daphnia pulex*, âgée de plus de 6 heures et de moins de 24 heures au début de l'essai, élevée en laboratoire, exempte de maladie et dont l'origine est connue (élevage — prétraitements éventuels, etc.).

1.6.4. *Mode opératoire*

Un essai préliminaire peut précéder l'essai définitif. Il fournit des informations sur la gamme des concentrations à utiliser pour l'essai définitif. Un essai témoin, réalisé avec les produits auxiliaires, mais en l'absence de la substance d'essai, doit être effectué en plus des séries d'essais.

Les daphnies sont exposées à la substance d'essai dans les conditions suivantes :

- durée :
au moins 24 heures,
- nombre d'organismes :
au moins 20 organismes par concentration d'essai, réparties de préférence en 4 lots de 5 ou en 2 lots de 10,
- charge biologique :
un minimum de 2 millilitres de la solution d'essai doit être fourni à chaque organisme,
- concentration d'essai :
la solution d'essai doit être préparée immédiatement avant l'introduction des daphnies, de préférence sans utiliser d'autres solvants que l'eau. En même temps que le témoin, on doit soumettre aux essais des concentrations formant une série géométrique, de rapport 1,8 permettant d'obtenir 0 et 100 % d'immobilisations après 24 heures et une série d'immobilisations intermédiaires permettant de calculer la CE_{50} — 24 heures,
- eau :
voir point 1.6.1.2.,
- lumière :
une photopériode est facultative; l'obscurité complète est acceptable,
- température :
la température de l'essai doit se situer entre 18 et 22 °C, mais elle doit, pour chaque essai, être constante à $\pm 1,0$ °C près,
- aération :
ne pas aérer par barbotage,
- nourriture :
néant.

Le pH et la concentration en oxygène des témoins et de toutes les concentrations d'essai devraient être mesurées en fin d'essai; le pH des solutions d'essai ne devrait pas être modifié.

Les substances volatiles doivent être soumises à l'essai dans des récipients remplis et hermétiquement clos, suffisamment grands pour éviter tout défaut en oxygène.

Les daphnies sont examinées au moins après 24 heures d'exposition et à nouveau après 48 heures, si l'essai a été prolongé.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Reporter sur du papier log-probit les pourcentages d'immobilisation cumulés en fonction des concentrations après une exposition d'au moins 24 heures. Relier les points obtenus et noter la concentration correspondant à 50 % d'immobilisation.

Si les données sont adéquates, la concentration médiane CE_{50} et ses limites de confiance ($p = 0,05$) peuvent être estimées en utilisant une méthode classique.

La valeur de la CE_{50} devrait être arrondie à un ou au maximum deux chiffres significatifs.

Dans les cas où la pente de la courbe est trop accentuée pour que l'on puisse calculer la CE_{50} , il suffit de donner une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives, dans un rapport de 1,8, ne donnent que 0 ou 100 % d'immobilisation, ces deux valeurs suffisent pour indiquer dans quelles limites se situe la CE_{50} .

Si on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance d'essai ne peut pas être maintenue, il conviendra d'interpréter les résultats avec prudence et de l'indiquer dans le procès-verbal.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- les informations sur l'organisme soumis à l'essai (non scientifique, espèce, fournisseur ou origine, prétraitement éventuel, méthode d'élevage, y compris source, nature, quantité et fréquence de l'alimentation),
- le nombre de daphnies utilisées dans chaque concentration d'essai,
- les concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité à ces concentrations de la substance d'essai dans la solution d'essai,
- la description des récipients utilisés pour l'essai: volume de la solution contenue dans chacun d'eux, nombre d'organismes,
- les méthodes utilisées et résultats si des analyses chimiques sont effectuées,
- l'origine de l'eau de dilution et ses principales caractéristiques,
- la méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'essai,
- les concentrations de tout produit auxiliaire utilisé (solvants organiques, dispersants, etc.),
- les informations concernant l'éclairage,
- la concentration d'essai la plus élevée ne provoquant aucune immobilisation pendant la période d'essai,
- la concentration d'essai la plus faible provoquant 100 % d'immobilisation pendant la période d'essai,
- les pourcentages d'immobilisation cumulés dans l'essai témoin, dans l'essai témoin avec le produit auxiliaire et dans chaque concentration d'essai, pour les périodes d'observation recommandées (24 heures ou 24 et 48 heures),
- les valeurs de CE_{50} pour chaque période d'observation recommandée (avec les limites de confiance à 95 %, si possible),
- la représentation graphique des pourcentages d'immobilisation en fonction des concentrations à la fin de l'essai,
- les méthodes statistiques utilisées pour déterminer les valeurs de CE_{50} ,
- la pente de la courbe au bout de 24 heures et ses limites de confiance de 95 %,
- la concentration de l'oxygène dissous, les valeurs du pH et la température des solutions d'essai,
- si une substance de référence est utilisée, son nom et les résultats obtenus,
- les critères de qualité doivent être respectés.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C (81) 30, Final.
- (2) ISO Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) ISO/6341.
- (3) AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea) NFT 90 301.
- (4) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).

*Appendice***Eau reconstituée***Exemple d'une eau de dilution correcte*

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau devrait être une eau distillée de bonne qualité, ou une eau déionisée dont la conductivité est inférieure à $5 \mu\text{S cm}^{-1}$.

Solutions mères

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (chlorure de calcium dihydrate): dissous dans l'eau jusqu'à obtention d'un litre.	11,76 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydrate): dissous dans l'eau jusqu'à obtention d'un litre.	4,93 g
NaHCO ₃ (hydrogénocarbonate de sodium): dissous dans l'eau jusqu'à obtention d'un litre.	2,59 g
KCl (chlorure de potassium): dissous dans l'eau jusqu'à obtention d'un litre.	0,23 g

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 millilitres de chacune des quatre solutions mères et diluer jusqu'à obtention d'un litre.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous.

Le pH doit être de $7,9 \pm 0,3$. Si nécessaire, l'ajuster avec NaOH (hydroxyde de sodium) ou HCl (acide chlorhydrique).

L'eau de dilution ainsi préparée est laissée au repos pendant environ 12 heures et n'a plus besoin d'être aérée.

La somme des ions Ca/Mg de cette solution est de 2,5 mmol/l. Le rapport des ions Ca:Mg est de 4:1 et celui des ions Na:K est de 10:1.

L'alcalinité totale de cette solution est de 0,8 mmol/l.

Toute déviation dans la préparation de l'eau de dilution ne doit pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

C. 3. DÉGRADATION BIOTIQUE: TEST DE SCREENING OCDE MODIFIÉ

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

Le but de la méthode est de mesurer la biodégradabilité de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau, en milieu aqueux, en aérobose, à une concentration initiale correspondant à 5 à 40 milligrammes par litre de carbone organique dissous par litre. Si les limites de sensibilité des analyseurs de carbone organique étaient améliorées, il pourrait être avantageux, en particulier, pour les composés toxiques d'utiliser des concentrations d'essai plus faibles. Il convient de déterminer la teneur en carbone organique de la substance d'essai.

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration d'essai (5 à 40 mg de COD/l):

- sont solubles dans l'eau,
- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'ont pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur les surfaces en verre.

Il est utile de connaître les proportions relatives des principaux éléments constitutifs de la substance d'essai pour interpréter les résultats obtenus, notamment lorsque ceux-ci sont peu élevés.

La connaissance du seuil de toxicité de la substance vis-à-vis des micro-organismes peut être intéressante pour interpréter les résultats peu élevés et pour choisir les concentrations d'essai appropriées.

1.2. Définitions et unités

La dégradation est exprimée en pourcentage de disparition du COD par rapport à sa valeur initiale.

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_o - C_{bl(o)}} \right] \times 100$$

- D_t = dégradation en pourcentage de disparition en COD, au temps t
 C_o = concentration initiale en COD du milieu de culture (mg de COD par litre)
 C_t = concentration en COD du milieu de culture au temps t (mg de COD par litre)
 $C_{bl(o)}$ = concentration initiale en COD du témoin (mg de COD par litre)
 $C_{bl(t)}$ = concentration en COD du témoin, au temps t (mg de COD par litre).

1.3. Substances de référence

Il est souhaitable d'utiliser des substances de référence appropriées pour vérifier l'activité de l'inoculum. Il peut être fait usage à cet effet d'aniline, d'acétate de sodium ou de benzoate de sodium (par exemple). La dégradation de ces substances doit être supérieure ou égale à 70 % en 10 jours, à compter du jour où le taux de biodégradation observé est pour la première fois supérieur à 10 %. Pour que l'essai soit valable, ces résultats doivent être obtenus dans le délai de 28 jours. Dans le cas contraire, il devrait être répété en utilisant un inoculum d'origine différente.

1.4. Principe de la méthode d'essai

On dissout dans un milieu minéral (solution d'éléments nutritifs minéraux, enrichie à l'aide d'une solution d'oligo-éléments et d'une solution de vitamines indispensables) une quantité définie de substance de façon à obtenir une concentration correspondant à 5 à 40 milligrammes de COD par litre. On ensemence ensuite cette solution avec un petit nombre de micro-organismes appartenant à différentes souches, on l'aère à 20 à 25 °C et on la maintient dans l'obscurité ou sous lumière diffuse.

La dégradation est suivie par détermination du COD pendant une période de 28 jours.

La méthode est contrôlée à l'aide d'une substance de référence.

Des « essais à blanc » ne contenant ni substance d'essai, ni substance de référence, seront effectués parallèlement pour déterminer les concentrations en COD des milieux.

1.5. Critères de qualité

La reproductibilité de la méthode a été établie lors de l'essai d'intercomparaison de la CEE et de l'OCDE.

La concentration la plus basse de la substance d'essai pour laquelle la méthode est applicable est déterminée dans une grande mesure par la limite de détection de l'analyse du carbone organique (0,5 mg C/l, actuellement) et par sa concentration dans la solution nutritive.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Eau

L'eau déminéralisée ou l'eau distillée exemptes des traces de substances toxiques (cuivre en particulier), sont généralement utilisées comme solvant. Seule l'eau qui a été déminéralisée par distillation ou par échange d'ions peut être utilisée.

L'eau distillée ne doit pas contenir plus de 10 % du carbone organique introduit par la substance d'essai.

Une eau d'une grande pureté est indispensable pour l'analyse du COD à des concentrations comprises entre 0 et 40 milligrammes par litre. Des contaminations proviennent non seulement des impuretés contenues dans l'eau mais aussi des résines échangeuses d'ions et de proliférations microbiennes (bactéries ou algues se développant sous l'action de la lumière, etc.). Un même lot doit être utilisé pour une série d'essais et l'eau doit être contrôlée au préalable par analyse du COD. Si nécessaire, elle peut être purifiée par irradiation UV ou par d'autres moyens.

1.6.1.2. Solution nutritive

La solution nutritive contient par litre 1 millilitre de chacune des solutions a) à f) ci-après dans de l'eau (1.6.1.1) (les initiales PA signifient « de qualité analytique reconnue »).

- | | |
|---|------------|
| a) KH_2PO_4 (dihydrogénophosphate de potassium): | PA 8,50 g |
| K_2HPO_4 (monohydrogénophosphate de potassium): | PA 21,75 g |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (monohydrogénophosphate de sodium dihydrate): | PA 33,40 g |
| NH_4Cl (chlorure d'ammonium): | PA 20,00 g |
| dissoudre et compléter à 1 000 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1). | |
| Le pH doit être de 7,2. | |
| b) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfate de magnésium heptahydrate): | PA 22,50 g |
| dissoudre et compléter à 1 000 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1). | |
| c) CaCl_2 (chlorure de calcium): | PA 27,50 g |
| dissoudre et compléter à 1 000 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1). | |
| Cette solution doit être préparée juste avant l'essai. | |

- d) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [chlorure de fer (III) hexahydrate]: PA 0,25 g
dissoudre et compléter à 1 000 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1).
- e) Solution d'oligo-éléments extemporané
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [sulfate de manganèse (II) tétrahydrate]
 (= 30,23 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): PA 39,9 mg
 H_3BO_3 (acide borique): PA 57,2 mg
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfate de zinc heptahydrate): PA 42,8 mg
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ [heptamolybdate d'ammonium (IV)]
 [= 36,85 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]: PA 34,7 mg
 Fe-chélaté = (FeCl₃ EDTA) PA 100,0 mg
 dissoudre et compléter à 1 000 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1).
 Stérilisation de la solution mère d'oligo-éléments à 120 °C, sous 2 atmosphères,
 durant 20 minutes.
- f) Solution de vitamines
 Biotine: PA 0,2 mg
 Acide nicotinique: PA 2,0 mg
 Thiamine: PA 1,0 mg
 Acide p-aminobenzoïque: PA 1,0 mg
 Acide pantothénique: PA 1,0 mg
 Pyridoxamine: PA 5,0 mg
 Cyanocobalamine: PA 2,0 mg
 Acide folique: PA 5,0 mg
 dissoudre et compléter à 100 ml à l'aide d'eau (1.6.1.1).
- La solution est filtrée sur membrane stérile de 0,2 micromètre. À la place de la solution 1.6.1.2 (f), on peut utiliser 15 mg d'extrait de levure dissous dans 100 millilitres d'eau (1.6.1.1).

1.6.1.3. Substances de référence

Aniline (fraîchement distillée), acétate de sodium, benzoate de sodium.

1.6.1.4. Solution de chlorure mercurique

1 % de HgCl_2 dans l'eau (1.6.1.1).

1.6.2. Appareillage

1.6.2.1. Agitateur pouvant recevoir les fioles d'Erlenmeyer de 2 litres avec réglage automatique de la température ou placé dans une enceinte thermostatée à 20–25 °C.

1.6.2.2. Fioles d'Erlenmeyer de 2 litres à col étroit. Avant usage, ceux-ci doivent être soigneusement nettoyés à l'acide chlorhydrique en solution alcoolique, rincés et séchés pour éliminer tous les résidus provenant des essais précédents. Même s'ils sont neufs, ils doivent être nettoyés de la même manière pour supprimer tout risque de contamination.

1.6.2.3. Dispositif de filtration sur membrane

1.6.2.4. Membranes filtrantes de 0,2 micromètre.

1.6.2.5. Analyseur de carbone

1.6.3. Préparation de l'inoculum

L'ensemencement peut être effectué à l'aide d'un des 4 protocoles décrits ci-avant, sa validité étant vérifiée au moyen d'une substance de référence (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculum à base d'effluent secondaire

Il est préférable de choisir un effluent secondaire de bonne qualité, provenant d'une installation traitant plus particulièrement les eaux ménagères. Cet effluent doit être aéré depuis le prélèvement jusqu'à l'utilisation. Il est filtré sur un filtre grossier, en écartant les 200 premiers millilitres. Le filtrat, convenablement aéré, doit être utilisé le jour même.

1.6.3.2. Inoculum à base de terre

100 grammes de terre (fertile, non stérile) sont mis en suspension dans 1 000 millilitres d'eau potable exempté de chlore (les terres à forte teneur en argile, sable ou carbone organique ne peuvent pas être utilisées). Après agitation, il y a lieu de laisser reposer la suspension durant 30 minutes.

Le surnageant est alors filtré sur un papier filtre grossier en écartant les 200 premiers millilitres. Le filtrat est aéré immédiatement et l'aération est continuée jusqu'à son utilisation; il doit être employé le jour même.

1.6.3.3. Inoculum à base d'eau de surface

Un échantillon d'eau de surface est filtré sur un papier filtre grossier, en écartant les 200 premiers millilitres. Le filtrat, convenablement aéré jusqu'à utilisation, doit être employé le jour même.

1.6.3.4. Inoculum mixte

Des volumes égaux des 3 types d'échantillons d'inoculum précédemment définis sont mélangés avec soin, de façon à obtenir l'inoculum final.

La validité de l'inoculum est vérifiée à l'aide d'une substance de référence (1.6.1.3).

1.6.4. Mode opératoire

Les substances d'essai ainsi que la substance de référence (1.6.1.3) sont soumises respectivement à des essais en double et un essai à blanc. Les essais à blanc sont réalisés avec inoculation, mais sans addition de substance d'essai ou de référence.

On prépare une solution mère de la substance d'essai dans l'eau (1.6.1.1). On ajoute à la solution nutritive (1.6.1.2) la quantité de cette solution-mère qui permet d'obtenir une concentration de 5 à 40 milligrammes de COD par litre. La substance de référence (1.6.1.3) doit être soumise à essai à la concentration initiale correspondant à 20 milligrammes COD par litre.

Dans chacun des deux récipients (1.6.2.2), on verse 900 millilitres du milieu nutritif ainsi préparé et on ensemence avec 0,5 millilitre d'inoculum (1.6.3). On recouvre les récipients avec une feuille d'aluminium (par exemple) en évitant de perturber les échanges gazeux entre le récipient et l'atmosphère environnante (le coton ne peut pas être utilisé à cause de l'analyse du COD). On dispose ensuite les récipients sur l'agitateur maintenu à une température constante de 20 à 25 °C pendant l'essai et à l'abri de la lumière. L'air ambiant doit être exempt de polluants et de substances toxiques (solvants chlorés, etc.).

Au cours de l'essai de biodégradation, les concentrations en COD font l'objet d'une double détermination le premier jour et les vingt-septième et vingt-huitième jours. Trois analyses supplémentaires au moins (aux alentours des septième, quatorzième et vingt et unième jours) doivent être effectuées pour suivre l'évolution de la dégradation.

Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume strictement nécessaire. La centrifugation ou la filtration sur membrane, préalables à la détermination du carbone, demandent des volumes

différents suivant les équipements. Les pertes dues à l'évaporation du milieu de culture doivent être corrigées par ajout de la quantité d'eau nécessaire (1.6.1.1).

Avant chaque prélèvement, le milieu doit être soigneusement agité et les substances adhérant aux parois du récipient doivent être dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons filtrés ou centrifugés doivent être analysés le jour même; sinon, il faut leur ajouter 0,05 millilitre de la solution de HgCl_2 (1.6.1.4) pour 10 millilitres de milieu ou bien les conserver entre 2 et 4 °C jusqu'à 24 heures, ou au-dessous de 18 °C pour des périodes plus longues.

Si on observe un plateau avant le vingt-huitième jour, l'essai peut être considéré comme terminé. Si la dégradation a nettement commencé avant le vingt-huitième jour sans atteindre un plateau, il est souhaitable de prolonger l'essai pendant 1 ou 2 semaines.

Toutes ces opérations exigent beaucoup de soins et les récipients, pipettes, etc., doivent être très propres (mais non stériles).

1.6.5. Détermination du COD

Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'adsorbent pas la substance d'essai au cours de la filtration.

Si les échantillons sont centrifugés, il y a lieu d'effectuer cette opération à $40\,000\text{ ms}^{-2}$ (environ 4 000 g) de préférence dans une centrifugeuse réfrigérée, en tout cas à moins de 40 °C.

Remarque

À de très faibles concentrations, il semble que la différenciation COT: COD par centrifugation ne soit pas satisfaisante, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est redissous. À de plus fortes concentrations ($\geq 10\text{ mg/l}$), l'erreur de centrifugation semble comparativement faible pour une inoculation identique.

L'échantillon prélevé (environ 30 ml) est immédiatement centrifugé ou filtré sur membrane au moyen du dispositif de filtration (1.6.2.3) en utilisant des membranes filtrantes traitées comme indiqué au point 1.6.2.4. Les 20 premiers millilitres du filtrat sont écartés.

La concentration en COD du filtrat restant (environ 10 ml) est déterminée à deux reprises à l'aide de l'analyseur de carbone (1.6.2.5). Si le filtrat ne peut pas être analysé le jour même, il doit être conservé comme indiqué au point 1.6.4.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Les résultats des déterminations sont transcrits suivant modèle ci-joint (appendice 1) et les valeurs de la biodégradation sont calculées conformément à 1.2.

Les concentrations en COD sont arrondies au dixième de milligramme par litre le plus proche, les valeurs moyennes du D_t au pourcentage le plus proche.

Le déroulement de l'essai de dégradation est représenté graphiquement sur un diagramme dont un modèle est joint (appendice 2).

Les résultats de l'essai de dégradation sont valables si dans la même série d'essais la substance de référence montre un pourcentage d'élimination en COD $\geq 70\%$ en 10 jours, à compter du jour où le taux de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10%. Ce résultat doit être obtenu dans un délai de 28 jours, soit la durée de l'essai, sinon toute la série est à éliminer.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra si possible:

- les données fournies (appendice 1),

- le déroulement de l'essai de dégradation est représenté dans un diagramme indiquant la phase de latence, la phase de dégradation, la pente de la courbe, l'intervalle de temps. (L'« intervalle de temps » signifie ici une période de 10 jours débutant le jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %),
- les preuves de validité de l'essai (diminution en COD de la substance de référence \geq à 70 % en 10 jours, à compter du jour où la dégradation dépasse 10 %, ce résultat devant être obtenu dans le délai de 28 jours, soit la durée de l'essai).

3.2. Interprétation des résultats

Ce test étant très rigoureux, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement, mais que des travaux complémentaires seront nécessaires pour établir ce fait.

Les substances soumises à essai pour lesquelles un taux de biodégradation élevé est obtenu au cours de cet essai seront considérées comme facilement biodégradables, à condition que ce taux soit atteint en 10 jours à compter du jour où il dépasse pour la première fois 10 %.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301E. Decision of the Council C (81) 30 Final.
- (2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.
- (3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45-55.

Appendice 1

Dégradation biotique: test de screening OCDE modifié

Organisme responsable de l'essai:

Substance d'essai:

Expérience n°:

Données concernant l'essai

Concentration théorique:..... mg/l COD

Déterminations du carbone

	Flacon n°		Concentration en COD après x jours (mg/l)						
			0 (C ₀)						
Essai: solution nutritive minérale avec substance à tester et avec inoculation	1	a ₁							
		a ₂							
		$C_{a(t)} = \frac{a_1 + a_2}{2}$							
	2	b ₁							
		b ₂							
		$C_{b(t)} = \frac{b_1 + b_2}{2}$							
Témoin: solution nutritive minérale sans substance à tester mais avec inoculation	3	bl ₁							
		bl ₂							
		$C_{bl(t)} = \frac{bl_1 + bl_2}{2}$							

Évaluation des données brutes

Flacon n°	Calcul des résultats	% de perte en COD après x jours						
		0						
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0						
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0						
Moyenne (*)	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0						

(*) Il ne sera pas établi de moyenne entre D₁ et D₂ en cas d'écart important.

Dégradation biotique: test de screening OCDE modifié (Bulletin)

Organisme responsable de l'essai:

Directeur de l'étude:

Date du début de l'essai: Expérience n°

Substance d'essai:

Structure chimique:

Solution mère:

	mg/l	mg/l COT (*)	mg/l COD (**)
Concentration de la substance à tester			

(*) Un écart entre les valeurs COD et COT indique une solubilité insuffisante de la substance à tester.

(**) Toutes les valeurs COD sont déterminées après filtration sur membrane ou centrifugation.

Analyseur de carbone:

Inoculum:

Résultat du test $D_t = \dots\dots\dots$ % de perte en COD après $\dots\dots\dots$ jours.*Validation du résultat*

Substance de référence:

Résultat: $\dots\dots\dots$ % de perte en COD après $\dots\dots\dots$ jours.

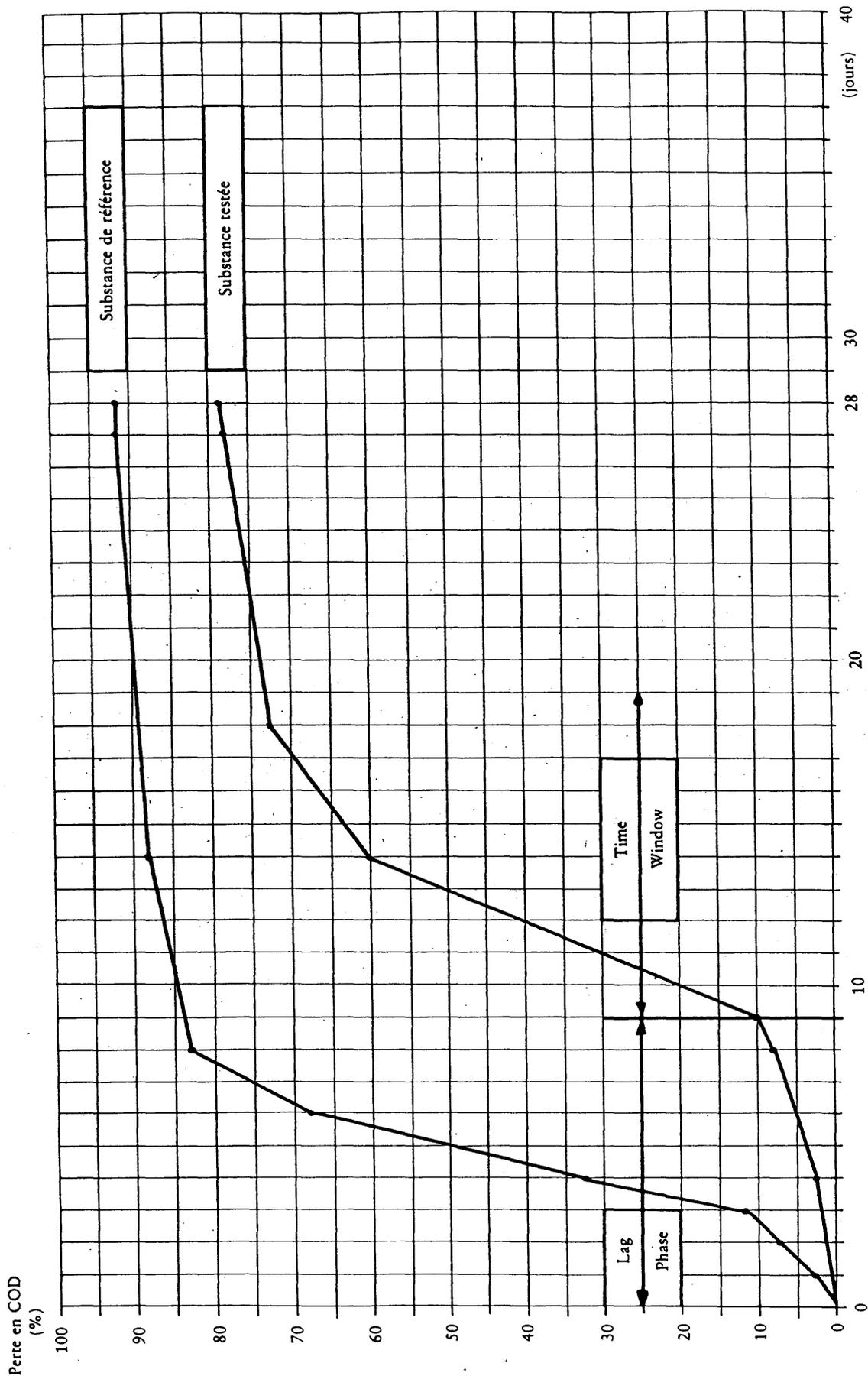
Expérience de référence n°:

Remarques.....
(Date).....
(Signature)

Appendice 2

Test de screening OCDE modifié

Organisation responsable de l'essai: Substance à tester: Expérience n°:



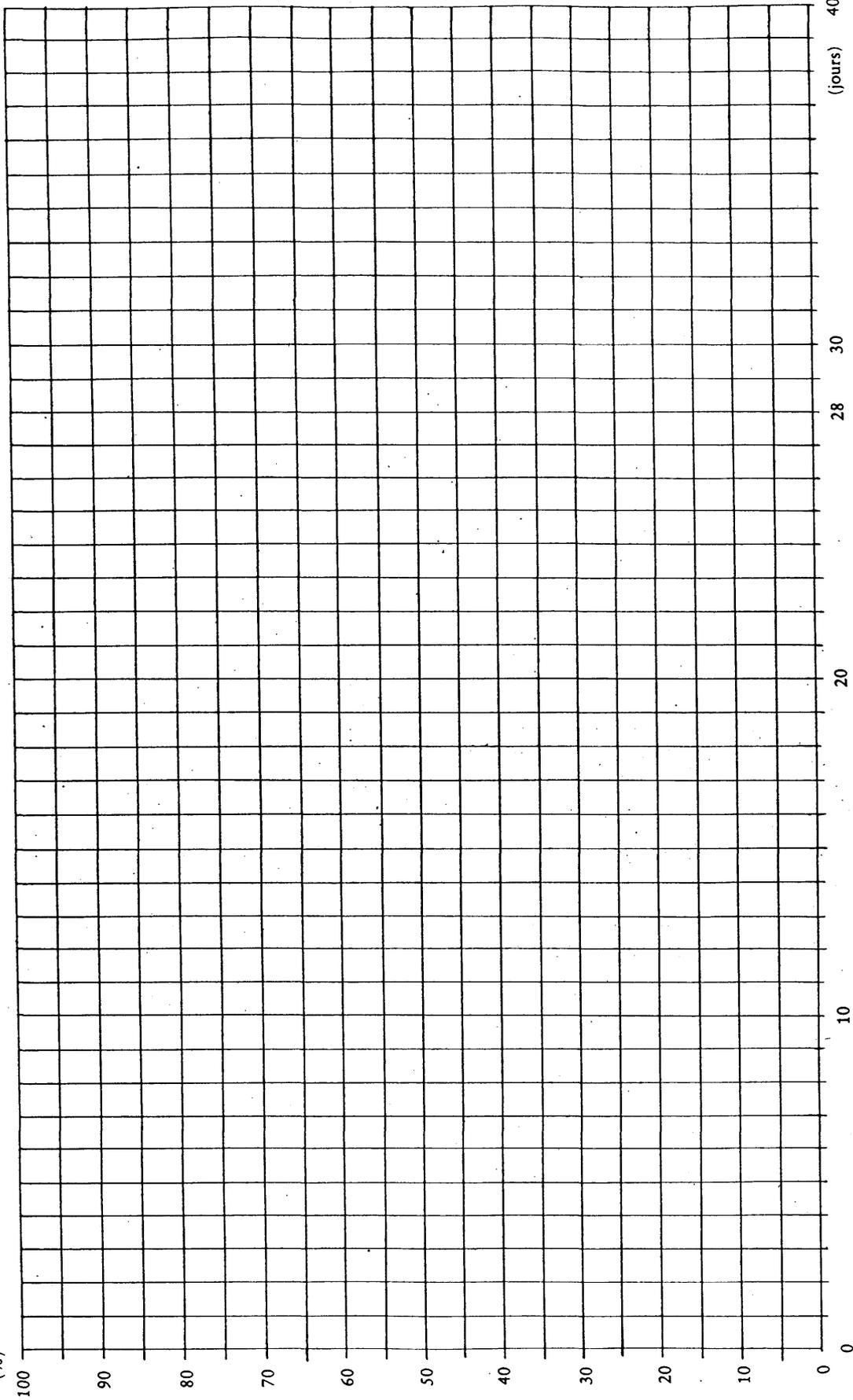
Test de screening OCDE modifié

Expérience n° :

Substance à tester :

Organisation responsable de l'essai :

Perte en COD (%)



C. 4. DÉGRADATION BIOTIQUE : ESSAI AFNOR NFT 90/302 MODIFIÉ

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La présente méthode a pour but de mesurer la biodégradabilité de composés organiques non volatils et solubles dans l'eau en milieu aqueux, en aérobiose et à une concentration initiale correspondant à 40 milligrammes de carbone organique dissous (COD) par litre. Si les limites de sensibilité des analyseurs du carbone organique étaient améliorées, il pourrait être avantageux, notamment pour les composés toxiques, d'utiliser des concentrations d'essai plus faibles.

La teneur en carbone organique de la substance d'essai doit être connue.

La méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée dans l'essai (40 mg COD/l):

- sont solubles dans l'eau,
- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'ont pas d'effets inhibiteurs vis-à-vis des bactéries,
- ne font pas l'objet d'une adsorption importante sur les surfaces en verre.

Les informations sur les proportions relatives des principaux composants de la substance d'essai seront utiles pour l'interprétation des résultats obtenus, notamment si ces résultats sont peu élevés.

Des informations sur la toxicité de la substance chimique vis-à-vis des micro-organismes peuvent être utiles pour l'interprétation de résultats peu élevés.

1.2. Définition et unités

La dégradation s'exprime en pourcentage de disparition du COD par rapport à sa valeur initiale:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

où

- D_t = dégradation, en pourcentage de disparition en COD, au temps t
 C_0 = concentration initiale en COD du milieu de culture (mg de COD/l)
 C_t = concentration en COD du milieu de culture au temps t (mg de COD/l)
 $C_{bl(0)}$ = concentration initiale en COD du témoin (mg de COD/l)
 $C_{bl(t)}$ = concentration en COD du témoin au temps t (mg de COD/l)

1.3. Substances de référence

Il est souhaitable de vérifier l'inoculum à l'aide de substances chimiques de référence, appropriées.

On peut utiliser à cet effet l'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium (par exemple), qui doivent montrer une élimination de la teneur en COD égale ou supérieure à 70 % en 28 jours, sinon l'essai est considéré comme nul et doit être recommencé en utilisant un inoculum provenant d'une autre source.

Dans cette méthode d'essai particulière, le glucose est utilisé notamment pour l'essai d'inhibition et pour tester l'activité de l'inoculum, ce qui peut être également fait avec l'aniline, l'acétate de sodium et le benzoate de sodium.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Les substances organiques dissoutes dans l'eau sont biodégradées par des micro-organismes chimio-organotrophes, qui les utilisent comme seules sources de carbone et d'énergie. Ces substances sont étudiées à une concentration telle que la teneur initiale en carbone organique soit égale à 40 milligrammes par litre. Le carbone organique restant en solution est mesuré au moins après 3, 7, 14 et 28 jours. Simultanément, on étudie les effets inhibiteurs éventuels de la substance d'essai vis-à-vis de l'inoculum. Le procédé est contrôlé au moyen d'une substance de référence.

1.5. Critères de qualité

La reproductibilité de la méthode a été établie lors de l'essai d'intercomparaison de la Communauté économique européenne et de l'Organisation de coopération et de développement économiques.

La concentration la plus basse de la substance d'essai pour laquelle cette méthode d'essai est applicable dépend dans une large mesure de la limite de sensibilité du dosage du carbone organique qui est, actuellement, de 0,5 milligramme de C par litre, et de la concentration en carbone organique dissous dans la solution nutritive.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Réactifs

Les produits chimiques doivent être de pureté analytique reconnue.

1.6.1.1 L'eau distillée

L'eau distillée ne doit pas renfermer plus de 10 % du carbone organique introduit par la substance d'essai.

1.6.1.2. Solution nutritive

Préparer le milieu d'épreuve comme indiqué ci-après, en utilisant du matériel stérile. Pour 1 litre de solution, dissoudre dans de l'eau distillée (PA = pureté analytique):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (sulfate d'ammonium):	PA 0,300 g
NH_4NO_3 (nitrate d'ammonium):	PA 0,150 g
KH_2PO_4 (dihydrogénophosphate de potassium):	PA 0,300 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (monohydrogénophosphate de sodium dodécahydrate):	PA 2,000 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sulfate de manganèse heptahydrate):	PA 0,050 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (chlorure de calcium dihydrate):	PA 0,050 g
Extrait de levure:	PA 0,005 g

Le pH est de $7,5 \pm 0,1$.

Ajouter 1 millilitre de la solution d'oligo-éléments de la composition ci-après:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [sulfate de fer (II) heptahydrate]:	PA 0,100 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [sulfate de manganèse (II) monohydrate]:	PA 0,100 g
K_2MoO_4 (molibdate de potassium):	PA 0,025 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (tétraborate de sodium décahydrate):	PA 0,025 g

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [chlorure de cuivre (II) dihydrate]	PA 0,025 g
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [nitrate de cobalt (II) hexahydrate]:	PA 0,025 g
ZnCl_2 (chlorure de zinc):	PA 0,025 g
NH_4VO_3 (vanadate d'ammonium):	PA 0,010 g

Eau distillée: 100 ml.

La solution d'oligo-éléments peut être conservée pendant 1 mois à une température comprise entre + 1 et + 4 °C.

Compléter au volume (1 litre) et homogénéiser. Le milieu doit être utilisé dans les 12 heures.

1.6.1.3. Substances de référence

Aniline (fraîchement distillée), acétate de sodium, benzoate de sodium, glucose.

1.6.2. Appareillage

Matériel courant de laboratoire et:

- appareil pour la mesure du carbone organique,
- spectrophotomètre,
- centrifugeuse (4 000 g),
- dispositif d'agitation permettant une aération et une agitation suffisantes,
- appareillage pour la mesure de l'oxygène dissous, pH-mètre, fioles coniques de 500 millilitres à large ouverture, stériles,
- appareillage pour la filtration stérile (membrane de 0,22 μm de porosité).

La verrerie doit être soigneusement nettoyée et totalement exempte de toute trace de matières organiques ou toxiques.

1.6.3. Préparation de l'inoculum

Prélever un volume suffisant d'un mélange de trois échantillons d'eaux de surface polluées et d'effluents de sortie de stations d'épuration urbaines, exempts de pollution spécifique importante. La teneur en bactéries de chaque échantillon doit être d'au moins 10^5 bactéries par millilitre.

Les échantillons doivent être utilisés pour l'ensemencement dans un délai de 12 heures, y compris le transport, et ne doivent pas rester plus de 6 heures sans aération.

Filter sur papier pour éliminer les particules insolubles les plus grosses, recueillir le filtrat et le passer sur la membrane à porosité de 0,22 micromètre

Laver avec une solution isotonique appropriée. Transférer les bactéries qui se sont déposées sur la membrane dans un petit volume d'une solution isotonique quelconque. Bien mélanger. Mesurer l'absorption à 620 nm et en déduire la concentration des bactéries en se reportant à une courbe-étalon établie préalablement par dénombrement sur milieu solide, en utilisant la souche *Pseudomonas fluorescens* ATCC 15453. Ajouter le volume de solution nécessaire pour ramener la concentration en bactéries à $(5 \pm 3) \times 10^7$ par millilitre. Utiliser l'inoculum dans l'heure qui suit.

1.6.4. Essai

L'incubation doit être effectuée en l'absence de toute lumière intense, dans un incubateur maintenu à une température de 20 à 25 °C et exempt de vapeurs toxiques.

Préparer les solutions suivantes:

1. Solution de la substance d'essai dans le milieu d'épreuve de manière à obtenir une concentration en carbone organique de 40 milligrammes par litre.
2. Solution de glucose dans le milieu d'épreuve de manière à obtenir une concentration en carbone organique de 40 milligrammes par litre.
3. Solution contenant dans le milieu d'épreuve les concentrations en substance d'essai et en glucose utilisées.
4. Disposer également d'un volume suffisant du milieu d'épreuve.

Mélanger séparément les quatre solutions et stériliser par filtration sur membrane.

Les membranes filtrantes conviennent s'il a été prouvé qu'elles ne libèrent pas de carbone et qu'elles n'adsorbent pas la substance pendant la filtration.

Toutes les manipulations nécessaires doivent être effectuées stérilement. Répartir les solutions dans les fioles d'essai (préalablement stérilisées) selon le schéma suivant:

Fiole n° 1 (essai):	150 ml de solution 1
Fiole n° 2 (essai):	150 ml de solution 1
Fiole n° 3 (essai):	150 ml de solution 1
Fiole n° 4 (témoin stérile):	150 ml de solution 1
Fiole n° 5 (témoin glucose):	150 ml de solution 2
Fiole n° 6 (témoin action inhibitrice):	150 ml de solution 3
Fiole n° 7 (blanc):	150 ml de solution 4.

Ensemencer les fioles 1, 2, 3, 5, 6 et 7 avec 1,5 millilitre d'inoculum et bien mélanger par agitation manuelle.

Prélever 3 à 5 millilitres dans chaque fiole.

Centrifuger les prélèvements à 4 000 grammes pendant 15 minutes, en maintenant une température inférieure à 26 °C.

Recueillir les surnageants en vue de dosages de carbone organique correspondant au temps zéro.

Placer les fioles sur l'agitateur et les y laisser pendant toute la durée de l'essai: au troisième jour, la concentration en oxygène dissous doit être au moins égale à 5 milligrammes par litre dans la fiole n° 5.

Tout comme pour les dosages de carbone organique au temps zéro, effectuer les mêmes dosages sur les fioles, 1, 2, 3, 5, 6 et 7 après une période d'au moins 3, 7, 14, 28 jours d'incubation. Cependant, si l'abaissement de la teneur en carbone atteint 95 % de la teneur initiale dans les fioles 1, 2 et 3, considérer l'essai comme terminé.

L'essai peut être terminé avant le vingt-huitième jour si un plateau a été atteint avant cette date.

Si une dégradation s'est manifestée au vingt-huitième jour, mais sans atteindre un plateau, il est souhaitable de prolonger l'essai pendant 1 ou 2 semaines.

En fin d'essai, faire un dosage du carbone organique dans la fiole n° 4 de la même manière qu'au temps zéro et tester la stérilité en ensemençant dans un tube de milieu de culture liquide et en faisant incuber à 25 °C pendant 5 jours.

Milieu de culture:

— extrait de levure déshydraté:	3 g
— peptone pancréatique de caséine:	6 g
— eau:	1 000 ml.

Dissoudre les composants du milieu complet déshydraté dans de l'eau bouillante. Si nécessaire, ajuster le pH de façon qu'il atteigne, après stérilisation, $7,2 \pm 0,2$ à 20 °C.

Si les dosages de carbone organique doivent être différés, conserver les surnageants à 4 °C, dans l'obscurité, dans des flacons de verre bouchés hermétiquement; la durée maximale de conservation

acceptable est de 24 heures. Si l'analyse ne peut être effectuée dans un délai de 24 heures, congeler à une température inférieure à -18°C .

Pour compenser les pertes d'eau dues à l'évaporation, vérifier avant chaque prélèvement le volume du milieu dans la fiole et ajouter, si nécessaire, de l'eau distillée stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,22 micromètre, pour ramener le volume à sa valeur mesurée après le prélèvement précédent.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Les résultats des analyses sont transcrits suivant modèle ci-joint (appendice 1) et les valeurs de la biodégradation sont calculées conformément au point 1.2.

Les résultats de l'essai de dégradation sont valables si les conditions suivantes sont remplies :

- le taux de dégradation du glucose dans la fiole n° 5 doit être d'au moins 80 % au septième jour,
- à la fin de l'essai, la fiole n° 4 doit toujours être stérile,
- la concentration en oxygène dissous au troisième jour dans la fiole n° 5 doit être d'au moins 5 milligrammes par litre.

Au septième jour, le taux de biodégradation du glucose dans la fiole n° 6 doit être au moins égal à 75 % de celui observé dans la fiole n° 5. Si cette limite n'est pas atteinte, on peut supposer que la substance soumise à l'essai présente un effet inhibiteur vis-à-vis des bactéries présentes et donc que la méthode ne lui est pas applicable à la concentration fixée.

Remarques

La comparaison des pourcentages d'élimination du carbone dans les fioles 1, 2 et 3, d'une part, et dans la fiole n° 4, d'autre part, permet de différencier les causes de la dégradation observée :

- phénomènes physico-chimiques dans la fiole n° 4,
- phénomènes physico-chimiques et biologiques dans les fioles 1, 2 et 3.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal de l'essai contiendra si possible une transcription de tous les résultats des expériences réalisées sur la substance d'essai, sur la substance de référence et sur les essais à blanc.

Mentionner notamment les points suivants :

- taux de disparition du produit dans la fiole n° 4 à la fin de l'essai,
- phénomènes d'inhibition éventuellement observés,
- preuves de validité de l'essai,
- le déroulement de l'essai de dégradation est représenté dans un diagramme indiquant la phase de latence, la phase de dégradation, la pente de la courbe et l'intervalle de temps (l'« intervalle de temps » signifie ici une période de 10 jours débutant le jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %).

3.2. Interprétation des résultats

En raison du caractère rigoureux de cet essai, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement; il indique simplement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Les substances chimiques d'essai pour lesquelles on obtient une perte importante de COD au cours de cet essai devraient être considérées comme facilement biodégradables, à condition que cette perte soit atteinte en 10 jours à compter du jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %.

4.

RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301A. Decision of the Council C(81)30, Final.
- (2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.
- (3) Gerike, P., Fischer W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, No. 1, 1981, p. 45-55.
- (4) AFNOR : Method for the evaluation in aqueous medium of the biodegradability of so-called « total » of organic products. T 90-302.

Appendice 1

Essai AFNOR modifié NF T 90/302 (Bulletin)

Expérience n°:
 Date de début de l'essai:
 Substance d'essai de référence:
 Conclusion théorique de l'essai:
 Dosage du carbone:

Dosage du carbone

Milieu de culture	Fiole n°	Concentration en COD après x jours en mg/l				
		t = 0	3	7	14	28 jours
Essai	1	1 _{C₀}	1 _{C₃}	1 _{C₇}	1 _{C₁₄}	1 _{C₂₈}
Essai	2	2 _{C₀}	2 _{C₃}	2 _{C₇}	2 _{C₁₄}	2 _{C₂₈}
Essai	3	3 _{C₀}	3 _{C₃}	3 _{C₇}	3 _{C₁₄}	3 _{C₂₈}
Moyenne	1-3	C ₀	C ₃	C ₇	C ₁₄	C ₂₈
Témoin stérile	4	4 _{C₀}	X	X	X	4 _{C₂₈}
Témoin glucose	5	5 _{C₀}	5 _{C₃}	5 _{C₇}	5 _{C₁₄}	5 _{C₂₈}
Témoin inhibiteur	6	6 _{C₀}	6 _{C₃}	6 _{C₇}	6 _{C₁₄}	6 _{C₂₈}
Témoin inoculum	7	C _{bl(0)}	C _{bl(3)}	C _{bl(7)}	C _{bl(14)}	C _{bl(28)}

Calcul

	t = 0	3	7	14	28 (jours)
Essai $\left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Témoin glucose $\left[1 - \frac{5C_t - C_{bl(t)}}{5C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
Témoin inhibiteur $\left[1 - \frac{6C_t - C_{bl(t)}}{6C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				

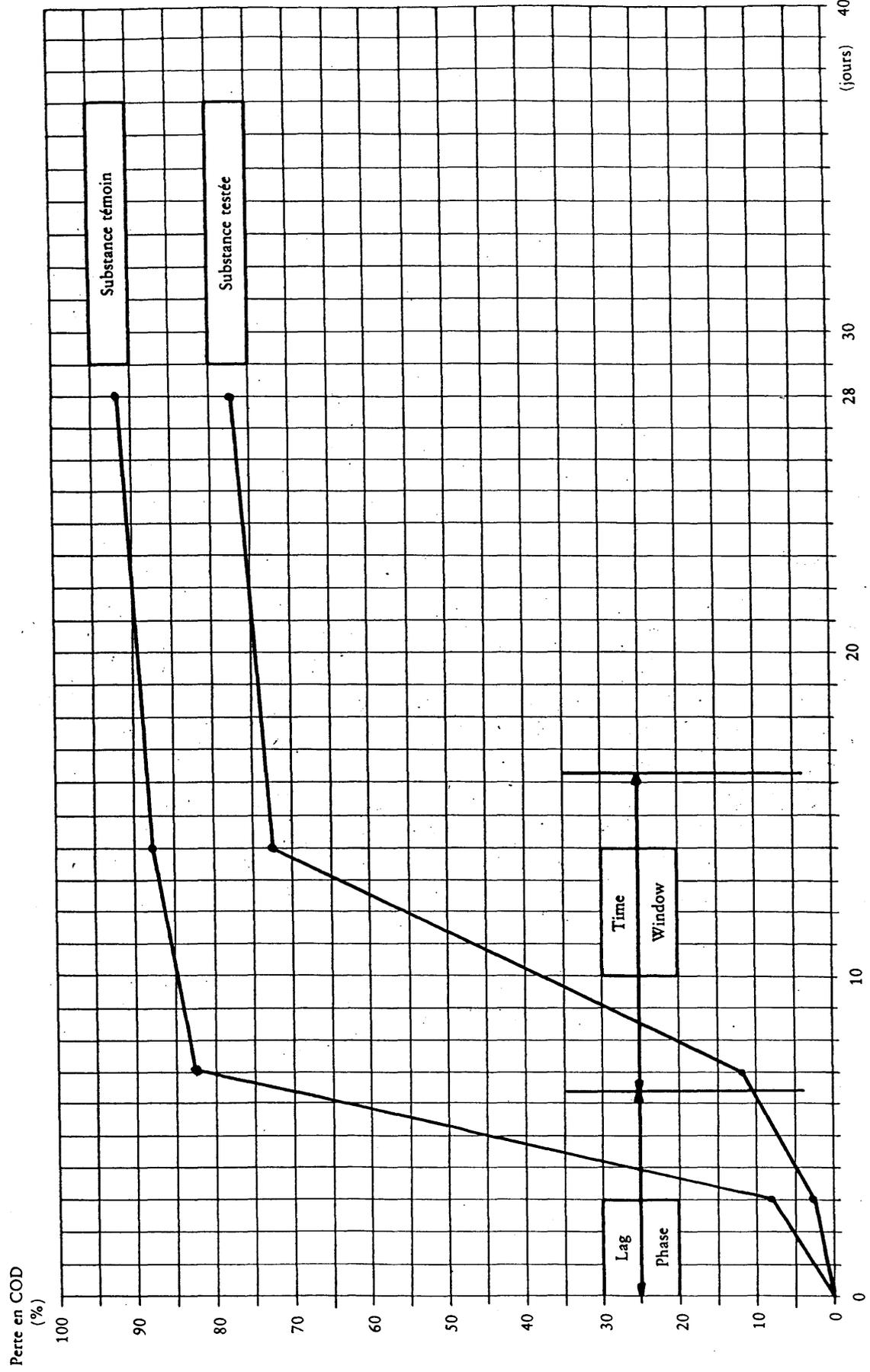
Validité:

- oxygène dissous, fiole n° 5, troisième jour: mg/l,
- pourcentage de biodégradation, fiole n° 5, septième jour: %,
- pourcentage de biodégradation, fiole n° 6, septième jour: %,
- stérilité, fiole n° 4:

Appendice 2

Essai AFNOR NF T 90/302 modifié

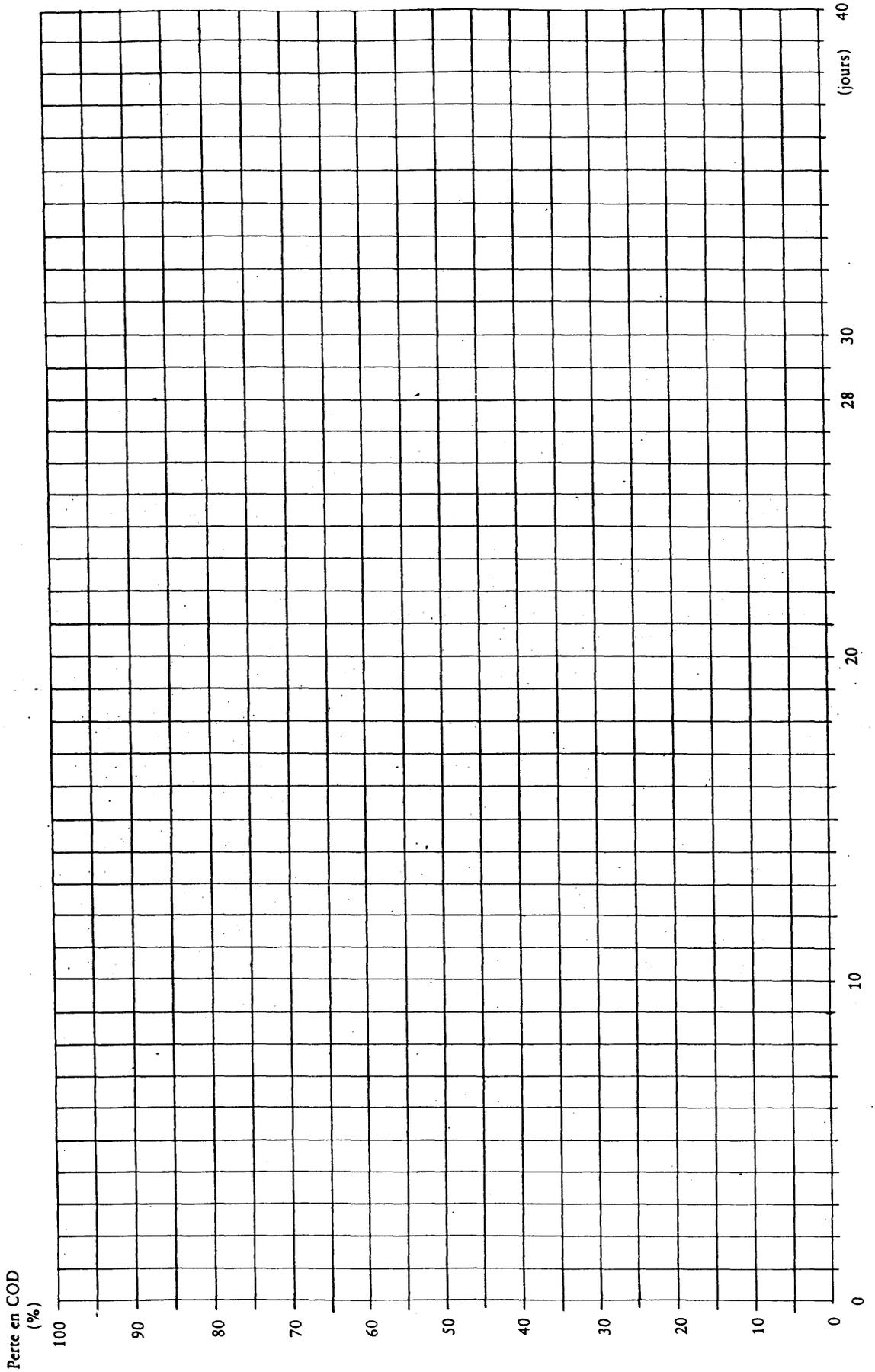
Organisation responsable de l'essai: Substance à tester: Expérience n°:



Essai AFNOR NF T 90/302 modifié

Organisation responsable de l'essai: Expérience n°:

Substance à tester:



C. 5. DÉGRADATION BIOTIQUE: ESSAI STURM MODIFIÉ

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

L'objectif de la méthode est la mesure de la biodégradabilité de substances organiques non volatiles dans un milieu aqueux, en aérobiose, pour deux concentrations initiales de 10 et de 20 milligrammes par litre (concentrations de base).

La teneur en carbone organique du produit à examiner doit être disponible (analyse de la teneur en carbone organique totale ou estimation à l'aide de la formule empirique permettant le calcul de la demande théorique en CO_2).

La méthode n'est applicable qu'aux substances d'essai organiques qui, pour la concentration utilisée dans l'essai :

- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'exercent pas d'action inhibitrice vis-à-vis des bactéries.

La méthode peut, en principe du moins, être appliquée aux substances peu solubles aux concentrations retenues.

Les informations sur les proportions relatives des principaux composants de la substance à examiner seront utiles dans l'interprétation des résultats obtenus, en particulier dans les cas où ces résultats sont faibles.

Les informations relatives à la toxicité de la substance chimique vis-à-vis des micro-organismes peuvent être utiles dans l'interprétation des résultats faibles et dans le choix des concentrations appropriées.

1.2. Définitions et unités

La dégradation est définie à partir de la quantité de CO_2 produite par la substance, exprimée en pourcentage de la valeur théorique de CO_2 qu'elle aurait dû produire (« ThCO_2 »), valeur calculée sur la base de la teneur en carbone organique de la substance à examiner.

1.3. Substances de référence

Il est recommandé d'utiliser une substance de référence appropriée pour vérifier l'activité de l'inoculum.

À cette fin, on peut utiliser, par exemple, de l'aniline, de l'acétate de sodium ou du benzoate de sodium, qui devront montrer une production de $\text{CO}_2 \geq 60\%$ dans les 28 jours, sinon le résultat ne devra pas être pris en compte et l'essai devra être répété avec un inoculum provenant d'une autre source.

1.4. Principe de la méthode d'essai

La substance d'essai est ajoutée à un milieu liquide définiensemencé au moyen de micro-organismes contenus dans de l'eau d'égout et aéré à 20 à 25 °C. La température est enregistrée pendant la période d'essai.

Le CO_2 libéré est capté sous forme BaCO_3 et la dégradation est suivie par analyse du CO_2 durant une période de 28 jours. Tenant compte des résultats d'essais témoins, la quantité totale de CO_2 produite

par la substance d'essai est déterminée pour la période d'essai et exprimé en pourcentage par rapport au CO₂ total que la substance examinée aurait du produire théoriquement, d'après sa teneur en carbone.

Le processus est contrôlé au moyen d'un inoculum témoin (voir point 1.6.1.3).

1.5. Critères de qualité

La reproductibilité de la méthode a été établie lors de l'essai d'intercomparaison de la Communauté économique européenne et de l'Organisation de coopération et de développement économiques.

La production endogène de CO₂ par l'inoculum, mesurée dans la fiole témoin, constitue la raison principale pour laquelle la substance d'essai à utiliser ne doit pas avoir une concentration inférieure à 5 milligrammes par litre. (Lorsque l'essai est adapté en vue de l'utilisation de substances de référence marquées au ¹⁴C, la concentration peut être nettement moins élevée.)

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Eau de « haute qualité »

Eau bidistillée, exempte de substances toxiques (en particulier de cuivre), d'une faible teneur en carbone (<2,0 mg/l COT) et d'une résistivité ≥ 18 mégohms par centimètre. L'eau distillée ne doit pas contenir plus de 10 % du carbone organique provenant de la substance d'essai.

1.6.1.2. Solution nutritive

a) Solution mère

FeCl ₃ ·6H ₂ O (chlorure de fer (III) hexahydrate) dissoudre dans 1 000 ml d'eau (1.6.1.1).	0,25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydrate) dissoudre dans 1 000 ml d'eau (1.6.1.1).	22,50 g
CaCl ₂ (chlorure de calcium), dissoudre dans 1 000 ml d'eau (1.6.1.1).	27,50 g
KH ₂ PO ₄ (dihydrogénophosphate de potassium)	8,50 g
K ₂ HPO ₄ (monohydrogénophosphate de potassium)	21,75 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (monohydrogénophosphate de sodium dihydrate)	33,40 g
NH ₄ Cl (chlorure d'ammonium) dissoudre dans 1 000 ml d'eau (1.6.1.1).	1,70 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (sulfate d'ammonium) dissoudre dans 1 000 ml d'eau (1.6.1.1).	40,00 g

b) Milieu d'essai

Le milieu d'essai contiendra, par litre, les quantités de solution suivantes :

- 4 ml de solution de chlorure ferrique,
- 1 ml de solution de sulfate de magnésium,
- 1 ml de solution de chlorure de calcium,
- 2 ml de solution de phosphate,
- 1 ml de solution de sulfate d'ammonium.

La valeur du pH devrait être de 7,2 ± 0,2.

1.6.1.3. Substances de référence

Aniline (fraîchement distillée), acétate de sodium, benzoate de sodium.

1.6.1.4. Hydroxyde de baryum 0,025 N (0,0125 M)

Dissoudre 4 grammes de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ par litre d'eau de haute qualité. Filtrer à l'aide d'un filtre en papier et sceller la solution limpide pour éviter l'absorption de CO_2 contenu dans l'air. Il est conseillé de préparer des quantités de solution de plus de 5 litres en vue de la série d'essais.

1.6.2. Appareillage

1.6.2.1. Appareillage de lavage du CO_2

Pour une série de 12 flacons d'essai (3 substances d'essai), il faut:

(Le flacon d'essai est un récipient en verre teinté d'une contenance de 4 à 5 litres. En cas d'utilisation de récipients en verre non teinté, l'essai doit être effectué dans l'obscurité.)

- 4 récipients en matière plastique, d'une contenance de 1 litre, remplis de 700 millilitres de NaOH 10 N (10 M),
- 1 fiole d'Erlenmeyer, d'une contenance de 1 litre, remplie de 700 millilitres de solution de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,025 N (0,0125 M),
- 1 fiole d'Erlenmeyer de 1 litre destinée à recevoir le trop-plein éventuel.

Ces récipients sont reliés en série, à l'aide d'un tube inerte, à une source d'air comprimé et l'air est injecté dans les solutions à débit constant.

Pour chaque série de 4 flacons d'essai supplémentaires, ajouter 1 flacon en plastique d'une contenance de 1 litre rempli de 700 millilitres de NaOH 10 N (10 M).

1.6.2.2. Appareillage de production de CO_2

- 4 flacons d'essai en verre teinté, d'une contenance de 4 à 5 litres, pour chaque substance d'essai.
- Bouchons, tubes flexibles, en matière plastique.

1.6.2.3. Flacons absorbeurs de CO_2

Flacons absorbeurs de 100 millilitres renfermant l'hydroxyde de barium.

1.6.3. Préparation de l'inoculum

Les organismes à utiliser pour les essais proviennent de boues activées fraîchement prélevées dans une station d'épuration municipale, fonctionnant normalement. Cette station ne devrait pas traiter ou ne traiter que peu d'effluents industriels.

Dès l'arrivée au laboratoire, la boue activée est aérée pendant 4 heures. 500 millilitres du mélange sont prélevés et homogénéisés mécaniquement pendant 2 minutes. Le mélange est alors décanté pendant 30 minutes.

Si le liquide surnageant contient toujours une quantité importante de particules solides après 30 minutes, on peut poursuivre la décantation pendant 30 à 60 minutes ou adapter la boue aux conditions de laboratoire pour obtenir une meilleure décantation.

Laisser décanter le liquide surnageant de manière à obtenir un volume suffisant pour assurer un ensemencement de 1 % par fiole d'essai destinée à mesurer le dégagement de CO_2 . Éviter d'entraîner un excédent de particules solides de boue, ce qui risquerait de fausser la mesure de la production de CO_2 .

Il est souhaitable de dénombrer les micro-organismes dans le surnageant. L'inoculum doit normalement contenir de 10^6 à 20×10^6 cellules par millilitre.

Il doit être utilisé le jour de sa préparation.

1.6.4. *Mode opératoire*1.6.4.1. *Solution mère*

Préparer une solution mère de substance d'essai par dissolution dans l'eau de haute qualité de façon à obtenir une concentration de 1 000 milligrammes par litre.

Les solutions mères sont préparées en tenant compte de la teneur en carbone organique de la substance d'essai. Si cette teneur est inconnue, amener les solutions mères à la concentration requise en tenant compte du poids des substances. Pour obtenir un échantillon homogène, bien mélanger tout en évitant la formation de mousse. Dans le cas des échantillons solides, il peut être nécessaire de faire fondre et de mélanger le contenu des récipients avant de prélever une partie aliquote. Cet aspect du mode opératoire est extrêmement important, car le calcul du taux de biodégradation ne peut être précis que si le carbone organique ajouté au système d'essai est en quantité définie.

À condition qu'il se situe entre 3 et 10, le pH de la solution mère ne doit pas être corrigé, sa valeur étant déterminée par le tampon phosphate entrant dans la composition du milieu d'épreuve. Si le pH se situe en dehors des limites indiquées, ajuster une partie aliquote de la solution mère à pH 7,0 ($\pm 1,0$) au moyen de HCl ou de NaOH 1 N (1 M) en veillant à ce que la solution soit soigneusement homogénéisée pendant l'addition d'acide ou de base.

Pour confirmer la concentration nominale en carbone organique de la substance d'essai, la solution mère (ou la part aliquote neutralisée) peut être soumise à une analyse du carbone organique total. Cette analyse s'impose également pour la solution mère de substance de référence.

Si la substance analysée n'est pas soluble dans l'eau, ajouter la quantité nécessaire de cette substance, en poids ou en volume, directement dans le flacon d'essai.

Si la substance à examiner n'est pas soluble aux concentrations retenues pour l'essai, il se peut qu'il faille prendre des mesures particulières, par exemple utiliser un procédé de dispersion par ultrasons, pour obtenir une bonne dispersion de la substance à soumettre à l'essai.

1.6.4.2. *Conditions d'essai*

L'inoculum devant être utilisé à 1 %, il faut procéder à des dilutions dans le milieu d'épreuve.

La façon la plus commode de procéder est la suivante:

- a) ajouter 2 470 millilitres d'eau de haute qualité (voir point 1.6.1.1) à chacun des flacons d'essai de 4 à 5 litres;
- b) ajouter, à chaque flacon d'essai de 4 à 5 litres, respectivement 3 millilitres de solution mère de sulfate d'ammonium, de sulfate de magnésium et de chlorure de calcium, ainsi que 6 millilitres de solution tampon phosphate et 12 millilitres de solution de chlorure ferrique;
- c) ajouter 30 millilitres d'inoculum provenant des boues activées à chacun des flacons d'essai de 4 à 5 litres.

Éliminer le dioxyde de carbone du mélange par barbotage pendant 24 heures, d'air exempt de CO₂.

Après la période d'aération, remplir trois flacons absorbeurs de 100 millilitres de Ba (OH)₂ de 0,025 N (0,0125 M) et les relier en série à la sortie de chaque flacon d'essai.

1.6.4.3. *Réalisation de l'essai*

Ajouter tout d'abord la substance d'essai à 2 des 4 flacons d'essai. Chaque substance est soumise à l'essai à deux concentrations: 10 et 20 milligrammes par litre. Calculer la quantité de solution mère nécessaire par tourie, d'après la formule suivante:

$$\text{quantité de solution mère par flacon d'essai, en ml: } \frac{B \times C}{A}$$

B = concentration de la substance d'essai dans le flacon d'essai (mg/l)

A = concentration de substance d'essai dans la solution mère (mg/l)

C = volume final du milieu d'essai dans le flacon d'essai (ml).

Ajouter dans les flacons d'essai appropriés une quantité suffisante de solution mère pour obtenir la concentration d'essai, suivant la formule ci-avant, et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir 473 millilitres (solution mère + eau de « haute qualité »). Ajouter dans le troisième flacon d'essai utilisé comme témoin et ne contenant pas de substance d'essai, 473 millilitres d'eau de « haute qualité ».

Le volume final de chaque flacon d'essai est dès lors de 3 000 millilitres.

Ajouter au dernier des 4 flacons d'essai une substance de référence à une concentration de 20 milligrammes par litre.

Commencer l'essai en injectant de l'air exempt de CO₂ dans la solution, à un débit de 50 à 100 millilitres par minute et par flacon d'essai (environ 1 à 2 bulles par seconde).

Dans le cas des substances d'essai non solubles dans l'eau, introduites à l'état sec dans le flacon d'essai, améliorer l'homogénéisation au moyen d'un agitateur magnétique. Pour les agents moussants, le barbotage à l'air exempt de CO₂ peut être remplacé par une aération au-dessus de la solution et une agitation par dispositif magnétique.

Le CO₂ produit dans chaque flacon d'essai réagit avec l'hydroxyde de baryum et est précipité sous forme de carbonate de baryum; la quantité de CO₂ produite est évaluée par titrage du Ba(OH)₂ résiduel avec du HCl titré à 0,05 N (0,05 M). Débrancher périodiquement (tous les 2 ou 3 jours) le flacon absorbéur de CO₂ le plus proche du flacon d'essai pour effectuer le titrage. Rapprocher les 2 flacons et introduire à la fin de la série un nouveau flacon absorbéur rempli de 100 millilitres de Ba(OH)₂ frais à 0,025 N (0,0125 M).

Effectuer les titrages en cas de besoins (avant l'apparition de précipités de BaCO₃ dans le second piège), approximativement tous les deux jours pendant les dix premiers jours, puis tous les cinq jours jusqu'au vingt-huitième jour.

Le vingt-septième jour, mesurer à nouveau le pH des solutions contenues dans les flacons d'essai puis y ajouter 1 millilitre de HCl concentré par flacon pour décomposer les carbonates. Aérer les flacons pendant la nuit et prélever des échantillons dans chacun d'eux pour déterminer le carbone organique dissous. Effectuer le titrage final le vingt-huitième jour.

Après avoir retiré les flacons absorbéurs les plus proches des flacons d'essai, titrer 100 millilitres de solution de Ba(OH)₂. Le Ba(OH)₂ est titré à l'aide d'HCl à 0,05 N (0,05 M), l'indicateur utilisé étant la phénolphthaléine.

Effectuer l'essai à température ambiante (20 à 25 °C) et enregistrer la température pendant toute la durée de l'essai.

Si un palier apparaît avant le vingt-huitième jour, l'essai peut être considéré comme terminé.

Si la dégradation a manifestement commencé au vingt-huitième jour, sans toutefois atteindre un palier, considérer qu'il convient de poursuivre l'essai durant 1 ou 2 semaines.

1.6.5. Détermination du CO₂

On pourrait envisager d'autres procédés de mesure du dégagement de CO₂ que le titrage en retour du Ba(OH)₂ contenu dans les pièges. Cela n'affecte en rien le principe de l'essai et cela pourrait même permettre une lecture continue du taux de la biodégradation à mesure que celle-ci évolue.

Le premier stade du calcul de la quantité de CO₂ produite doit faire intervenir un facteur de correction tenant compte de la production endogène de CO₂ par les flacons de substance d'essai. Le flacon témoin sert d'« ensemencement témoin » permettant une correction prenant en compte le CO₂ que doit produire la respiration endogène des bactéries. La quantité de CO₂ produite par la substance d'essai est déterminée par la différence (en ml de réactif de titration) entre le flacon absorbéur correspondant à l'essai et le flacon absorbéur correspondant au témoin.

En cas d'utilisation d'HCl à 0,05 N (0,05 M) pour le titrage dans le flacon absorbéur, chaque millilitre d'HCl titré correspond à 1,1 milligramme de CO₂ produit.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Les résultats des analyses sont notés dans le bulletin ci-joint (voir appendice 1) et les valeurs de la biodégradation sont calculées conformément aux indications du point 1.2.

Les concentrations de CO₂ sont calculées à 0,1 milligramme par litre près. Les valeurs de biodégradation sont arrondies à l'unité la plus proche.

Le déroulement de l'essai de dégradation est représenté graphiquement par un diagramme tel que celui ci-joint (voir appendice 2) à titre d'exemple.

Les résultats de l'essai de dégradation sont valables si les conditions suivantes sont remplies :

- il faut que, dans une même série, la biodégradation de la substance témoin soit \geq à 60 % pour 28 jours (si ce n'est pas le cas, la série entière doit être rejetée et l'essai doit être recommencé avec un inoculum provenant d'une autre source),
- il faut que, durant l'essai, aucune quantité significative de CO₂ n'ait été produite par les flacons d'essai témoin (contamination du milieu, du verre et de l'air). À la fin de l'essai, la production totale de CO₂ ne doit pas excéder 50 milligrammes de CO₂ par 3 litres de milieu.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible :

- les données représentées conformément au bulletin (voir appendice 1),
- le déroulement de l'essai de dégradation représenté dans un diagramme indiquant la phase de latence, la phase de dégradation, la pente de la courbe et l'intervalle de temps (l'« intervalle de temps » signifie ici une période de 10 jours débutant le jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %),
- le processus de dispersion pour les substances non solubles dans les conditions d'essai,
- la date et le lieu du prélèvement des organismes utilisés pour l'essai et le traitement subi par ces organismes avant l'inoculation,
- la gamme de température enregistrée durant la période d'essai,
- en cas de dénombrement conformément aux indications du point 1.6.2 (inoculation), le nombre de micro-organismes formant colonies par millilitre,
- les preuves de la validité de l'essai (\geq 60 % de dégradation en 28 jours dans les substances de référence).

3.2. Interprétation des résultats

Ce test étant très rigoureux, un résultat faible n'implique pas nécessairement que la substance étudiée n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement, un tel résultat indique simplement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Les substances chimiques d'essai présentant un taux de biodégradation élevé doivent être considérées comme facilement biodégradables, à condition que ce taux élevé soit atteint dans les 10 jours à compter du jour où le taux de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test guideline 301B. Decision of the Council C(81) 30, Final.
- (2) Gerike, P., Fisher, W. K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.
- (3) Gerike, P., Fisher, W.K., A correlation study of Biodegradability determinations with various chemicals in various tests II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45-55.
- (4) Larson, R. J., Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 38, 1979, p. 1153-1161.

Appendice 1

Bulletin à utiliser dans l'essai Sturm modifié

Expérience n°:

Date de début de l'essai:

Substance d'essai, de référence:

Concentration théorique retenue:

Analyse du carbone:

ThCO₂ théorique:

Gamme de température enregistrée pendant l'essai:

Production de CO₂:

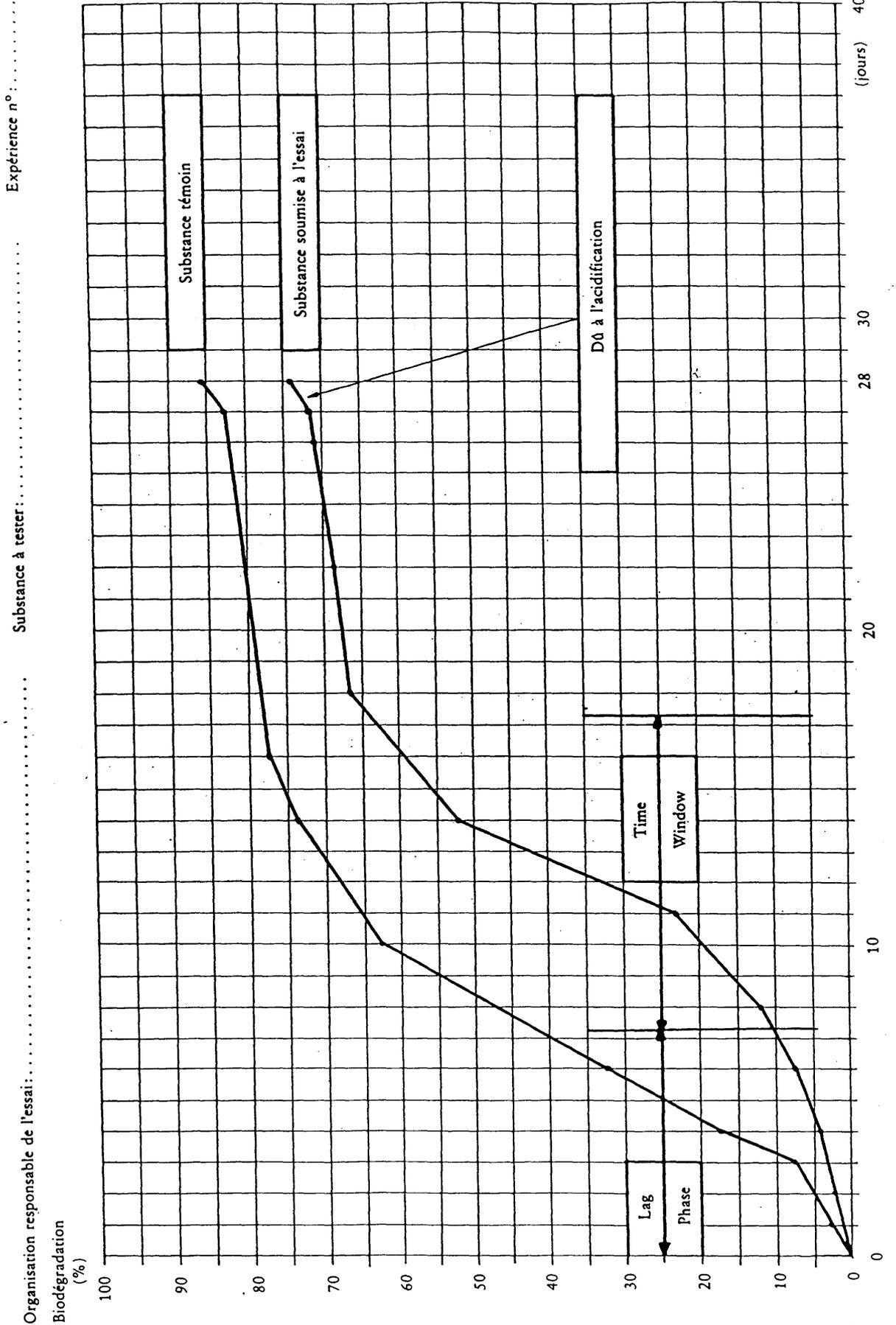
Jours	CO ₂ capté en mg	Quantité cumulative de CO ₂	% de ThCO ₂
28			

Validité:

— substance de référence et % de biodégradation:

— évolution totale du CO₂ dans les fioles d'essai témoin:

Appendice 2
Essai Sturm modifié

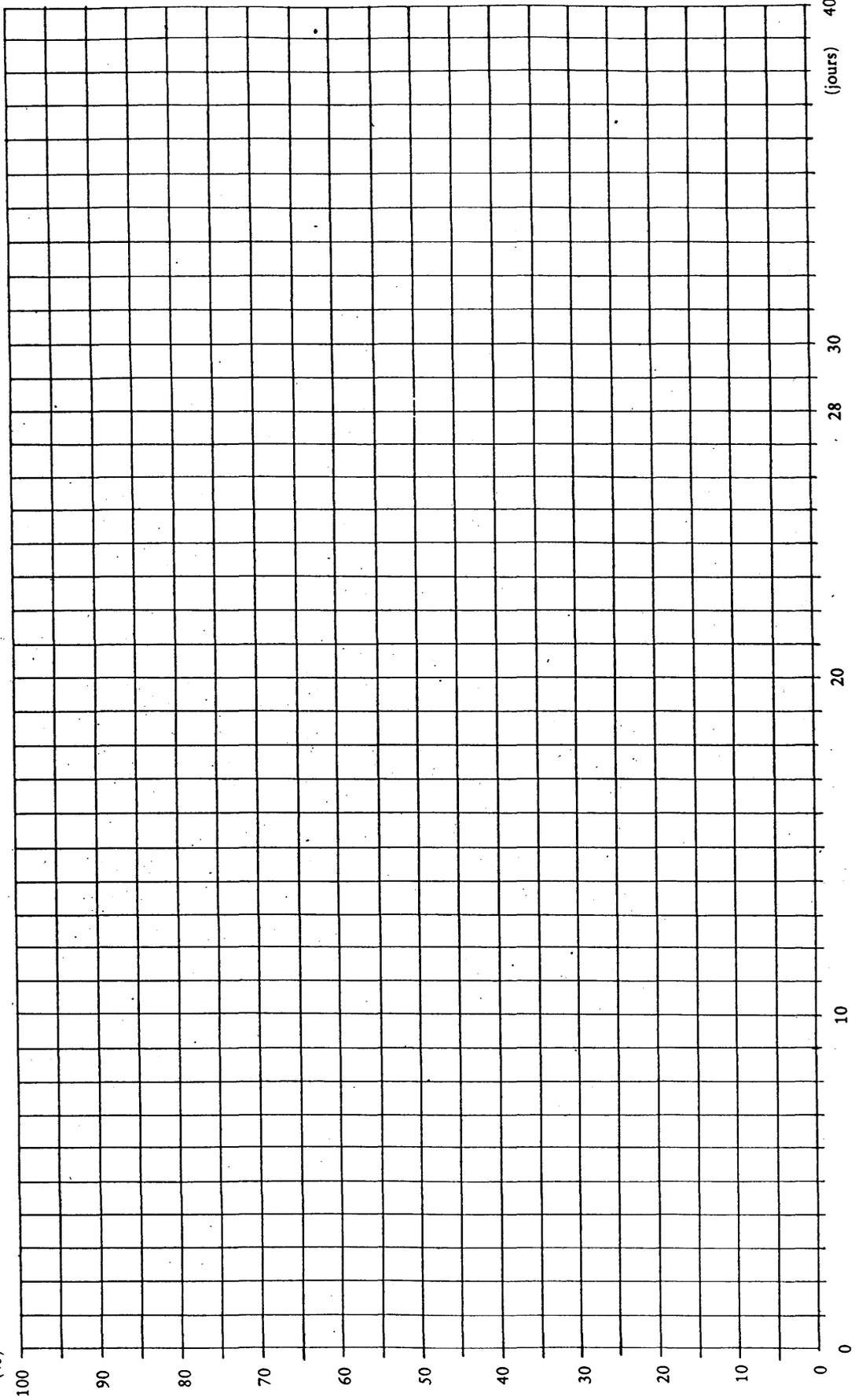


Essai Sturm modifié

Organisation responsable de l'essai: Expérience n°:

Substance à tester:

Biodégradation (%)



C. 6. DÉGRADATION BIOTIQUE : ESSAI EN FIOLE FERMÉE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

L'objectif de cette méthode est de déterminer la biodégradabilité des substances organiques en milieu aqueux, en aérobiose, à une concentration de 2 milligrammes par litre (concentration standard) à 10 milligrammes par litre.

Au stade actuel, le test convient particulièrement bien pour l'évaluation de la biodégradabilité des composés solubles dans l'eau. Toutefois, rien ne s'oppose en principe à l'étude de composés volatils ou faiblement solubles dans l'eau.

La formule empirique appliquée à la substance d'essai doit permettre de calculer la demande théorique en oxygène (DThO); si cette valeur n'est pas connue, on pourra utiliser comme valeur de référence la demande chimique en oxygène (DCO) de la substance d'essai (voir appendice 1).

La méthode n'est applicable qu'aux substances d'essai organiques qui, à la concentration utilisée lors de l'essai, n'inhibent pas les bactéries. Si la substance d'essai n'est pas soluble à la concentration prévue pour l'essai, il faudra éventuellement prendre des dispositions spéciales telles que la dispersion par ultrasons, afin d'obtenir une dispersion satisfaisante.

Des informations relatives aux proportions respectives des différents composants de la substance d'essai faciliteront l'interprétation des résultats obtenus, notamment lorsque ces résultats sont faibles.

Des informations relatives à la toxicité vis-à-vis des substances chimiques vis-à-vis des bactéries peuvent faciliter l'interprétation des résultats faibles ainsi que le choix des concentrations d'essai adéquates.

Cette méthode peut être utilisée pour la détermination de la DBO.

1.2. Définition et unités

La demande biochimique en oxygène (DBO) représente la différence de la consommation de l'oxygène entre un témoin et une solution de la substance d'essai dans les conditions de l'essai. Après division par la concentration (P/V) de la substance à tester, la consommation de l'oxygène est exprimée en mg DBO/mg de substance.

La dégradation se définit comme le rapport entre la demande biochimique en oxygène et la demande théorique en oxygène (DThO) ou la demande chimique en oxygène (DCO), exprimées en pourcentage.

Remarque

Parfois, les deux modes de calcul (pourcentage de la DThO ou pourcentage de la DCO) conduisent à des résultats différents.

$$\% \text{ de biodégradation (DThO)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg substance d'essai}}{\text{DThO}} \times 100$$

ou

$$\% \text{ de biodégradation (DCO)} = \frac{\text{mg O}_2/\text{mg substance d'essai}}{\text{mg DCO/mg substance d'essai}} \times 100$$

DThO = demande théorique en oxygène (calcul, voir appendice)

DCO = demande chimique en oxygène, déterminée expérimentalement

1.3. Substances de référence

Il est souhaitable de retenir des produits chimiques de référence adéquats pour évaluer l'activité de l'inoculum.

L'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium (par exemple) peuvent être utilisés à cette fin et devront présenter une dégradation $\geq 60\%$ en 28 jours, faute de quoi l'essai sera considéré comme non valable et devra être recommencé avec un inoculum provenant d'une autre source.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Dissoudre dans un milieu minéral (solution d'éléments nutritifs minéraux) une quantité déterminée de la substance d'essai de façon à obtenir une concentration de 2 milligrammes par litre. Ensemencer la solution avec un nombre restreint de micro-organismes appartenant à différentes espèces et maintenir en fioles fermées à température constante (20 à 21 °C), à l'abri de la lumière.

Le processus de dégradation est suivi par des analyses de l'oxygène pendant 28 jours. La procédure est contrôlée à l'aide d'une substance de référence. On effectuera un essai parallèle ne comportant ni substance d'essai, ni substance de référence pour déterminer la consommation témoin en oxygène.

Par la même occasion, on contrôlera la substance d'essai pour vérifier les effets d'inhibition éventuels vis-à-vis de l'inoculum.

1.5. Critères de qualité

La reproductibilité de la méthode a été établie lors de l'essai d'intercomparaison de la Communauté économique européenne et de l'Organisation de coopération et de développement économiques.

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Eau distillée ou déminéralisée

Eau distillée ou déminéralisée ne contenant pas plus de 0,01 mg Cu/l, saturée d'air. Le volume nécessaire aux opérations quotidiennes (50 litres par exemple) est maintenu à la température ambiante, avoisinant les 20 °C, et aéré vigoureusement pendant 20 minutes à l'aide d'air comprimé. Généralement, l'eau est prête à l'emploi après être demeurée 20 heures à 20 °C. La teneur en oxygène est déterminée à des fins de contrôle. Elle doit atteindre 9,09 mg O₂/l à 20 °C. Toutes les opérations de transfert ou de remplissage de l'eau saturée d'air doivent être effectuées par siphonnage, sans dégagement de bulles.

1.6.1.2. Solution nutritive

a) Solutions mères

KH₂PO₄ (dihydrogénophosphate de potassium): 8,50 g

K₂HPO₄ (monohydrogénophosphate de potassium): 21,75 g

Na₂HPO₄·2H₂O (monohydrogénophosphate de sodium dihydrate): 33,30 g

NH₄Cl (chlorure d'ammonium): 1,70 g

dissoudre dans 1 000 ml d'eau distillée.

Le pH doit être de 7,2.

MgSO₄·7H₂O (sulfate de magnésium heptahydrate): 22,50 g

dissoudre dans 1 000 ml d'eau distillée.

CaCl₂ (chlorure de calcium): 27,50 g

dissoudre dans 1 000 ml d'eau distillée.

FeCl₃·6H₂O [chlorure de fer (III) hexahydrate]: 0,25 g

dissoudre dans 1 000 ml d'eau distillée.

b) Milieu d'essai

Le milieu d'essai contiendra, par litre d'eau (1.6.1.1), 1 millilitre de chacune des solutions mères précitées.

Le pH sera égal à $7,2 \pm 0,2$.

1.6.1.3. Substances de référence

Aniline (récemment distillée), acétate de sodium, benzoate de sodium.

1.6.2. Appareillage

1.6.2.1. On peut utiliser des fioles d'essai jaugées, d'une capacité de 250 à 300 millilitres, avec bouchon en verre ou des fioles non jaugées à col étroit, de 250 millilitres, avec bouchon en verre dont le volume doit être déterminé.

1.6.2.2. Divers flacons de 2, 3 et 5 litres gradués pour la préparation de l'expérience et pour le remplissage des flacons de DBO.

1.6.2.3. Pipettes d'une capacité de 1 à 10 millilitres. Ampoules à décanter et papier-filtre grossier. Flacons pour la préparation de l'inoculum.

1.6.2.4. Bains-marie pour le maintien des flacons à température constante à l'abri de la lumière.

1.6.3. Préparation de l'inoculum

Une des quatre procédures suivantes peut être utilisée pour l'ensemencement et sa validité peut être contrôlée à l'aide d'une substance de référence (1.6.1.3).

1.6.3.1. Inoculum à base de terre

100 grammes de terre de jardin, à laquelle on n'a pas récemment ajouté d'engrais (il est particulièrement recommandé d'utiliser de la terre provenant d'une serre maintenue à une température constante durant toute l'année) sont mis en suspension dans 1 litre d'eau potable non chlorée. Après 30 minutes, la suspension est filtrée sur un papier-filtre grossier, les deux premiers millilitres de filtrat sont écartés. Le restant du filtrat sert d'inoculum (1 goutte par litre de volume final). L'inoculum doit être préparé juste avant l'essai. Il devra être aéré en cas de conservation pendant plusieurs heures. Le nombre de germes peut être déterminé par comptage sur gélose nutritive ou plaquettes nutritives. Il ne devrait pas y avoir plus de 10^3 à 10^5 germes par millilitre de volume final.

1.6.3.2. Inoculum provenant d'un effluent secondaire

Il est préférable de préparer l'inoculum en utilisant un effluent secondaire (installation de boues activées ou lits bactériens traitant plus particulièrement les eaux ménagères). L'effluent doit être aéré depuis son prélèvement jusqu'à son utilisation. En vue de la préparation de l'inoculum, l'échantillon est filtré à travers un papier-filtre grossier. Les premiers 200 millilitres sont écartés. Le reste du filtrat est convenablement aéré jusqu'au moment de son utilisation. L'inoculum doit être utilisé le jour même du prélèvement.

1.6.3.3. Inoculum provenant d'une « boue activée » de laboratoire

On utilise l'effluent provenant d'une installation expérimentale de boues activées, équipée d'un puissant dispositif d'aération. La solution d'inoculation est préparée comme indiqué au point 1.6.3.2.

1.6.3.4. Inoculum mixte

On mélange convenablement des volumes égaux des trois échantillons d'inoculation (1.6.3.1 à 1.6.3.3) de façon à obtenir l'inoculum final.

1.6.4. Mode opératoire

Toutes les manipulations réalisées avant incubation sont effectuées à une température voisine de 20 °C.

Différents lots de fioles (1.6.2.1) sont préparés pour la détermination de la DBO des substances d'essai et des substances de référence, lors de séries d'expériences simultanées (voir appendice 2). Si les analyses chimiques sont effectuées simultanément, il faut prévoir un nombre suffisant de fioles, y compris les fioles nécessaires au contrôle de l'inoculum et du témoin. On préparera par exemple 7 ou 15 fioles par substance soumise à des essais de 0, 5, 15 et 28 jours après avoir préparé un volume d'eau suffisant dans de grands flacons (1.6.2.2).

Ces grands flacons sont d'abord remplis d'eau distillée jusqu'au tiers de leur volume à l'aide d'un tuyau flexible (1.6.1.1). Ensuite, on introduit chacune des solutions mères nutritives (1.6.1.2) dans des flacons jusqu'à obtention du volume final et l'on ajoute les substances d'essai ou de référence jusqu'à ce que les concentrations définitives de 2 milligrammes par litre et parfois de 5 milligrammes ou de 10 milligrammes par litre soient atteints.

La concentration approximative de 9 milligrammes d'oxygène dissous par litre d'eau de dilution à 20 °C limite la concentration initiale possible de la substance d'essai à environ 2 milligrammes par litre, de manière à garantir le maintien d'une concentration en oxygène importante après l'oxydation de la substance.

Les substances à faible dégradabilité ou les substances dont le DTHO est faible peuvent être essayées parallèlement à des concentrations plus élevées.

L'ensemencement est réalisé à la pipette à raison d'une goutte par litre de volume final; on procède de même pour le témoin.

Enfin, la solution sera amenée au volume requis à l'aide d'un tuyau flexible touchant le fond du flacon. Il en résultera un mélange suffisant de la solution. Ensuite, chaque solution ainsi préparée sera versée immédiatement dans chaque lot respectif de fioles à l'aide d'un tuyau flexible plongeant aux trois quarts du flacon (pas jusqu'au fond).

En outre, les fioles destinées à l'examen au temps 0 sont analysées ou soumises à un traitement assurant leur conservation en vue des analyses ultérieures (pour la détermination de l'O₂, précipitation à l'aide de MnCl₂ et de NaOH).

Les autres fioles préparées parallèlement sont placées dans un bain-marie à 20 °C, à l'abri de la lumière; elles seront retirées du bain après 5, 15 et 28 jours et analysées.

Chaque série est accompagnée d'une série complète d'essais parallèles pour la détermination du témoin, la consommation de l'oxygène sans inoculation et la substance de référence.

Contrôle de l'inhibition:

Il est aisé et simple de contrôler les effets d'inhibition des substances dans un test en fiole fermée:

Série 1: 2 mg/l d'un composé facilement biodégradable, par exemple un alcool gras condensé avec oxyde d'éthylène en rapport moléculaire de 1:10, ou n'importe laquelle des substances chimiques de contrôle.

Série 2: x mg/l de la substance d'essai (x est habituellement égal à 2).

Série 3: 2 mg/l de composés facilement biodégradables, plus x mg/l de la substance d'essai.

Si les valeurs DBO de la série 3 sont inférieures à la somme des valeurs des séries 1 et 2, on peut considérer que la substance d'essai n'a pas d'effets d'inhibiteurs vis-à-vis des bactéries, à cette concentration. Ce contrôle est toujours nécessaire si une dégradabilité négative ou faible apparaît illogique au vu de la structure de la substance à tester, c'est-à-dire si certains indices permettent de supposer que cette faible dégradation est provoquée par des phénomènes d'inhibition.

1.6.5. Détermination de l'oxygène dissous

Le dosage de l'oxygène dissous s'effectue à l'aide de méthodes chimiques ou électrochimiques normalisées reconnues sur le plan international ou national.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

Les résultats de l'analyse sont mentionnés dans le bulletin ci-joint (voir appendice 3).

L'évolution de la dégradation est représentée graphiquement sur un diagramme.

Les résultats du test de dégradation sont valables si les conditions suivantes sont réunies :

- dans la même série d'essais, la substance de référence montre une biodégradation $\geq 60\%$ pour une durée de 28 jours. Si tel n'est pas le cas, toute la série doit être écartée;
- que la consommation de l'oxygène, sans inoculation, n'excède pas 0,3 milligramme d'oxygène par litre après 5 jours et 0,4 milligramme d'oxygène par litre après 28 jours; le témoin avec inoculation ne devra pas montrer une consommation $> 0,5$ milligramme d'oxygène par litre après 5 jours et 0,6 milligramme d'oxygène par litre après 15 à 28 jours.

3. RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible :

- les données enregistrées dans la forme prévue au bulletin (voir appendice 3),
- le déroulement de l'essai de dégradation représenté dans un diagramme indiquant la phase de latence, la phase de dégradation, la pente de la courbe, l'intervalle de temps (l'«intervalle de temps» signifie ici une période de 10 jours débutant le jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %),
- la méthode utilisée pour la détermination de la DCO,
- la méthode utilisée pour la mesure de l'oxygène,
- la justification et les commentaires scientifiques relatifs à toute modification de la procédure ou à l'élimination du test,
- la procédure de dispersion pour les substances faiblement solubles, dans le contrôle du test,
- le contrôle de la validité du test.

3.2. Interprétation des résultats

On tiendra compte de l'influence éventuelle des composés azotés sur les résultats.

L'essai ayant été mené dans des conditions très rigoureuses, un résultat faible ne signifie pas nécessairement que le composé testé n'est pas biodégradable dans les conditions de l'environnement, mais qu'il faudra effectuer des travaux supplémentaires pour se faire une opinion.

Les substances chimiques d'essai se caractérisant par une consommation élevée en oxygène dans le présent essai doivent être considérées comme facilement biodégradables à condition que ce niveau soit atteint dans les 10 jours à compter du jour où le niveau de biodégradation observé excède pour la première fois 10 %.

4. RÉFÉRENCES

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301D. Decision of the Council C(81)30, Final.
- (2) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 3, No 2, 1979, p. 159-173.
- (3) Gerike, P., Fischer, W. K., A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various test II. Additional results and conclusions, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 5, No 1, 1981, p. 45-55.

Appendice 1

Calcul de la demande biochimique théorique en oxygène (DThO)

La DThO du composé $C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$, de poids moléculaire PM est calculée en appliquant la relation suivante:

$$DThO_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

Cette relation implique que C est minéralisé en CO_2 , H en H_2O , P en P_2O_5 et Na en Na_2O . L'halogène est éliminé sous la forme d'halogénure d'hydrogène et l'azote sous la forme d'ammoniac.

Exemple: glucose $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$DThO = \frac{16 \left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose.}$$

Pour le calcul des poids moléculaires des sels autres que les sels des métaux alcalins, on suppose que ces sels ont été hydrolysés.

Le soufre est supposé oxydé à l'état de + 6.

Exemple: n — alkylbenzènesulfonate de sodium, $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$DThO = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg de substance.}$$

Dans le cas de certains composés contenant de l'azote, ce dernier peut être également éliminé sous la forme d'ammoniac, de nitrite ou de nitrate suivant les différentes demandes biochimiques théoriques en oxygène.

$$DThO_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

En supposant qu'une formation totale de nitrate ait été observée par analyse, par exemple dans le cas d'une amine secondaire: $(C_{12}H_{25})_2NH$, PM = 353

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg de substance.}$$

Appendice 2

Schéma de la répartition des fioles par test en fiole formée
 (* pour analyse spécifique éventuelle)

	Contrôle		Détermination	
Analyses	Eau distillée Solutions nutritives ↓ Solution d'éléments nutritifs (contrôle du témoin d'oxygène)	Eau distillée Solutions nutritives Inoculation ↓ Témoin d'inoculation	Eau distillée Solutions nutritives Inoculation Composé d'étalonnage ↓ Substances de référence	Eau distillée Solutions nutritives Inoculation Substance d'essai ↓ Substance d'essai
Immédiates				
5 jours	O ₂ - det.	O ₂ - det.	O ₂ - det.	O ₂ - det.
15 jours				
28 jours				

Appendice 3

Dégradation biotique: test en fiole fermée (bulletin)

Laboratoire:

Directeur des études:

Date du début de l'essai: Expérience n°:

Substance d'essai:

Composition chimique:

Analyse (méthode Winkler ou l'électrode à oxygène):

DThO ou DCO de la substance à tester mg O₂/mg

Température de l'eau de dilution après aération:

Concentration d'oxygène de l'eau après aération, et au début de l'essai: mg O₂/l

Inoculum:

*Résultat de l'essai*D_t = DBO exprimé en % DThO après 28 jours

ou

D_t = DBO exprimé en % DCO après 28 jours*Validation du résultat*

Substance de référence:

Résultat: DBO exprimé en % DThO après 28 jours

Expérience de référence n°:

Remarques

Laboratoire:

Substance d'essai:

Expérience n°

A. Déterminations de l'oxygène

	Fiole n°	Analyses	mg O ₂ après x jours			
			0	5	15	28
Solution nutritive minérale sans substance à tester et sans inoculation	Contrôle d'O ₂	c ₁		—	—	—
		c ₂		—	—	—
	Moyenne	$m_0 = \frac{c_1 + c_2}{2}$				
Solution nutritive minérale sans substance à tester mais avec inoculation	1	c ₃				
	2	c ₄				
	Moyenne blanc	$m_b = \frac{c_3 + c_4}{2}$				
Solution nutritive minérale avec substance à tester et avec inoculation	1	a ₁				
	2	a ₂				
	Moyenne substance à tester	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$				

B. Consommation d'O₂ (mg DBO/l) après x jours

$$DBO_x = (m_0 - (m_{b_x}) - (m_0 - m_x) (*)$$

mg DBO/l après x jours		
5	15	28

(*) Cette différence est importante pour le contrôle de la validité de l'essai.

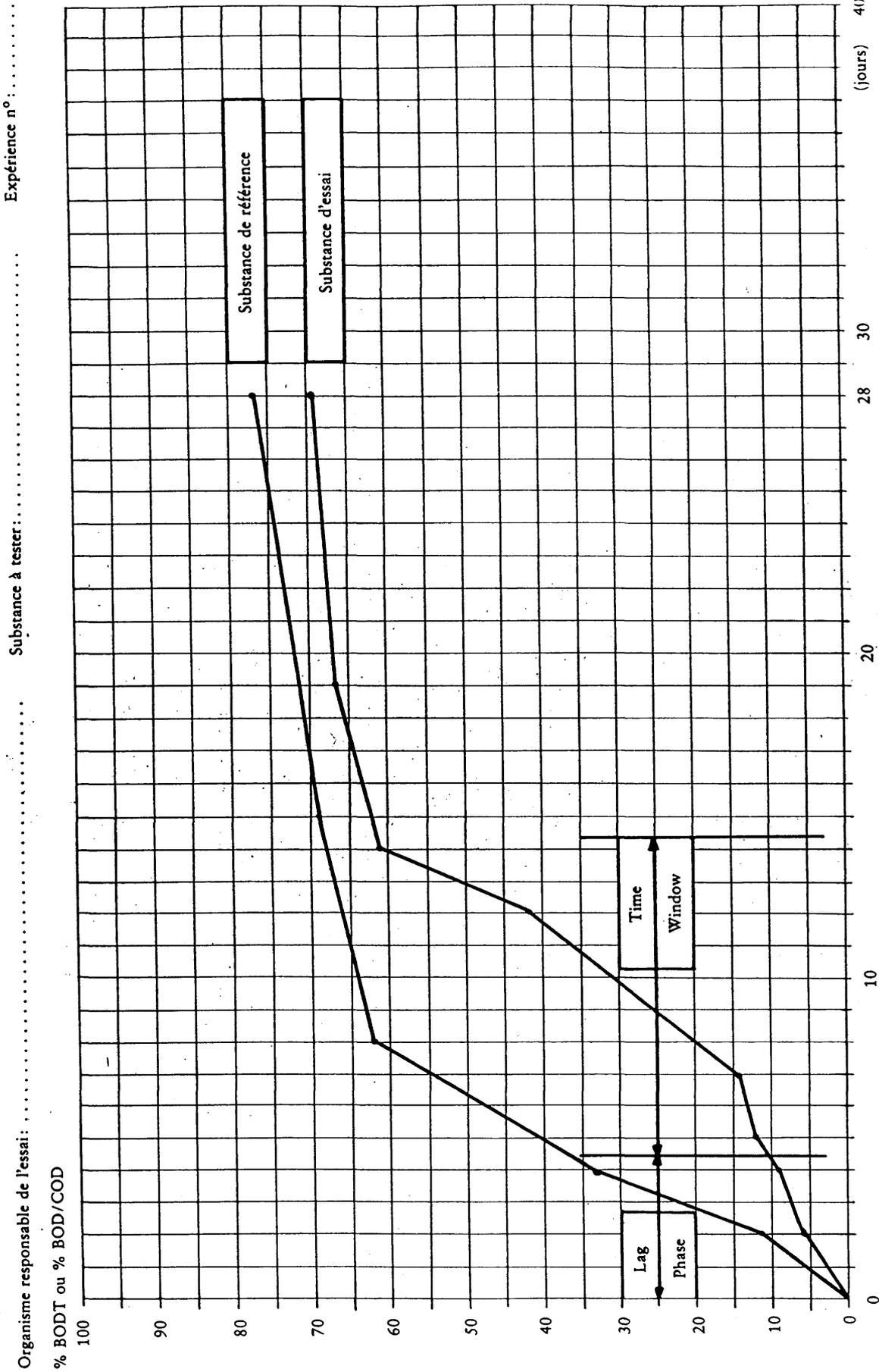
C. Évaluation

$$D_t = \frac{\text{mg DBO}_x/\text{l}}{\text{mg S}_E(**)/\text{l}} \cdot 100 \quad \text{ou} \quad DBO_x/\text{DCO} = \frac{\text{mg DBO}_x/\text{l}}{\text{mg SE/l} \cdot \text{DCO}} \cdot 100$$

	après x jours		
	5	15	28
% DBO/DThO			
% DBO _x /DCO			

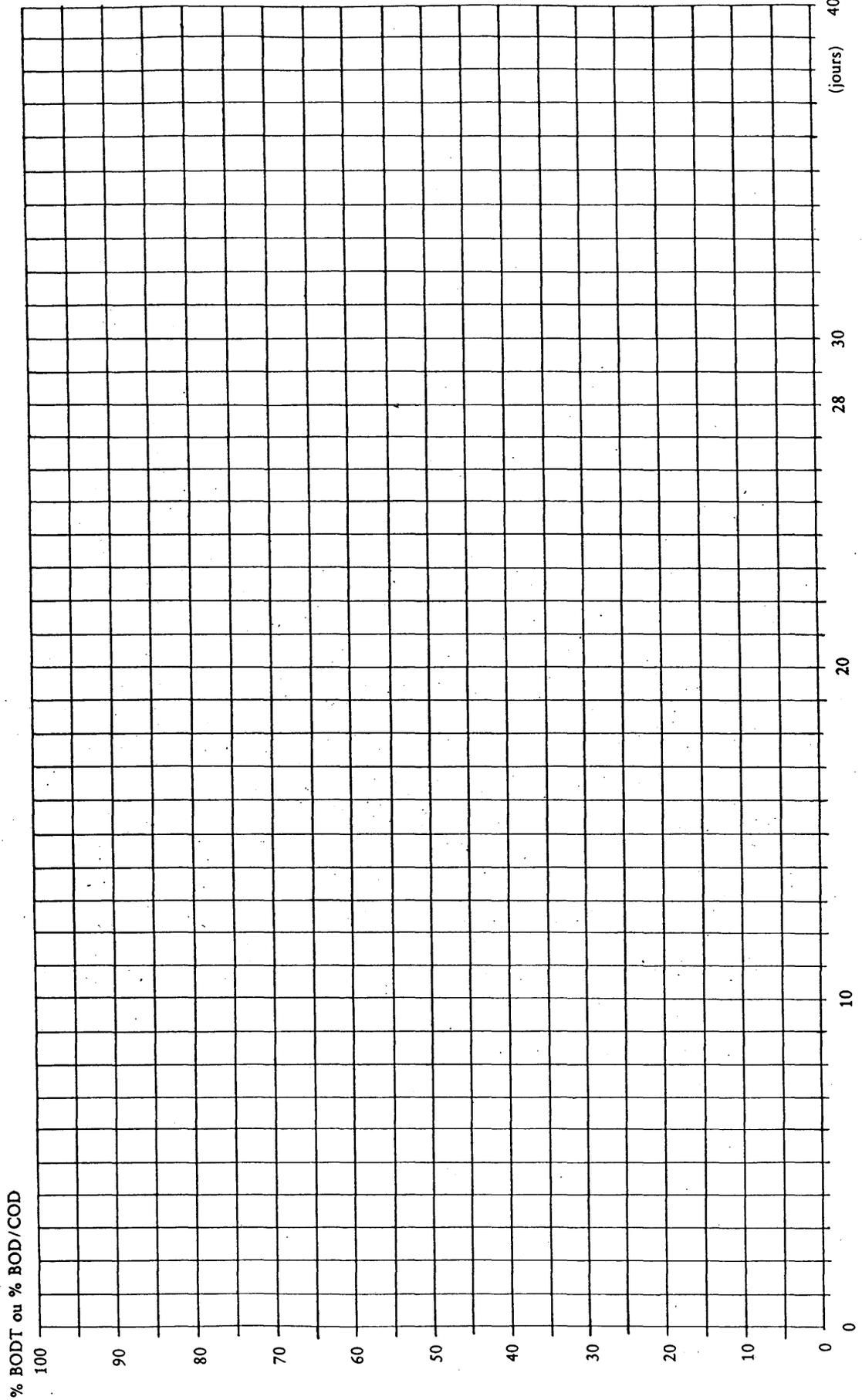
(**) Substance d'essai.

Appendice 4
Essai en fiole fermée



Essai en fiole fermée

Organisation responsable de l'essai : SubSTANCE à tester : Expérience n° :



C. 7. DÉGRADATION BIOTIQUE : ESSAI MITI MODIFIÉ

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La présente méthode d'essai a pour objet la mesure de la biodégradabilité des substances organiques en milieu aqueux, au moyen d'un respiromètre indiquant la demande biochimique en oxygène.

Il convient de disposer de la formule empirique du produit soumis à l'essai, de façon à pouvoir calculer la demande théorique en oxygène (DThO); sinon, la demande chimique en oxygène (DCO) peut être utilisée. La présente méthode n'est applicable qu'aux substances organiques qui, à la concentration utilisée pour l'essai:

- ont une pression de vapeur négligeable,
- n'inhibent pas les bactéries,
- ne sont pas en contact avec l'absorbant du CO₂ et ne réagissent pas avec lui.

Si la substance soumise à l'essai n'est pas soluble à la concentration de l'essai, on peut recourir à des procédures spéciales, telles que la dispersion par ultrasons, de façon à obtenir une dispersion suffisante.

Des informations sur la toxicité de la substance chimique vis-à-vis des micro-organismes peuvent se révéler utiles pour l'interprétation de résultats indiquant une biodégradation limitée ainsi que pour choisir les concentrations appropriées.

Des informations sur les proportions relatives des principaux composants de la substance examinée seront utiles pour interpréter les résultats obtenus.

1.2. Définition et unités

$$\text{taux de dégradation} = \frac{\text{DBO} - \text{B}}{\text{DThO (ou DCO)}} \times 100 \%$$

ou

$$\text{taux de dégradation} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100 \%$$

où

- DBO = Demande biochimique en oxygène (expérimentale) (mg) du produit soumis à l'essai, telle qu'elle est relevée sur la courbe de DBO
- B = Consommation en oxygène (expérimentale) (mg) du milieu de culture de base auquel l'inoculum est ajouté, telle qu'elle est relevée sur la courbe de DBO
- DThO = Demande théorique en oxygène pour une oxydation complète (théorique) du produit soumis à l'essai (mg)
- Sa = Quantité résiduelle (expérimentale) (mg) de produit soumis à l'essai à l'issue de l'essai de biodégradabilité
- Sb = Quantité résiduelle (expérimentale) (mg) de produit soumis à l'essai témoin, au moyen d'eau à laquelle on aura uniquement ajouté le produit soumis à l'essai.

1.3. Substances de référence

Afin de vérifier l'activité de l'inoculum, il est souhaitable d'utiliser des substances de référence, telles que l'aniline, l'acétate de sodium ou le benzoate de sodium. Si le taux de dégradation de l'aniline, calculé

d'après la consommation d'oxygène, ne dépasse pas 40 % après 7 jours et 65 % après 14 jours, l'essai est considéré comme nul.

Si la dégradation dans l'essai témoin (Sb bas) se révèle importante, l'essai est également considéré comme nul.

1.4. Principe de la méthode

Les produits à examiner constituent la seule source de carbone organique dans le milieu et il n'y a pas d'adaptation préalable des micro-organismes aux produits à examiner.

On utilise un appareil automatique de mesure de la consommation d'oxygène en circuit fermé (appareil de mesure de la DBO). Les substances chimiques qui font l'objet de l'essai, placées dans les récipients d'essai, sontensemencées au moyen de micro-organismes. Pendant la durée de l'essai, on mesure en continu la demande biochimique en oxygène au moyen de l'appareil de mesure de la DBO. On calcule la biodégradabilité sur la base de la DBO et d'une analyse chimique complémentaire, telle que la mesure de la concentration du carbone organique dissous, de la concentration des produits résiduels, etc.

1.5. Critères de qualité

1.5.1. Répétabilité

Généralement bonne, notamment pour les substances chimiques dont la solubilité dans l'eau est supérieure à 0,1 gramme par litre.

1.5.2. Sensibilité

A) Consommation d'oxygène: limite de détection = 1 milligramme (oxygène consommé par les micro-organismes).

B) Analyse chimique: dépend de la sensibilité des techniques analytiques utilisées.

1.5.3. Spécificité

Cette méthode s'applique à toute substance chimique non volatile, pour laquelle $(C)_{\text{eau}} / (C)_{\text{air}} \geq 1$. Pour les produits volatils, il convient d'utiliser un « appareil de mesure de la DBO modifié », qui consiste en un appareil normal équipé de tubes capillaires (voir appendice 1).

1.6. Description de la méthode d'essai

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. L'eau distillée ne doit pas contenir plus de 10 % du carbone organique introduit par la substance examinée.

1.6.1.2. Milieu de culture de base

Prendre 3 millilitres de solution A, de solution B, de solution C et de solution D, et ajouter de l'eau pour compléter le volume jusqu'à 1 000 millilitres (utiliser de l'eau déionisée dans tous les cas).

A) K_2HPO_4 (monohydrogénophosphate de potassium):	21,75 g
KH_2PO_4 (dihydrogénophosphate de potassium):	8,50 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ (monohydrogénophosphate de sodium dodécahydrate):	44,60 g

NH ₄ Cl (chlorure d'ammonium):	1,70 g
Dissoudre et compléter le volume jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau (1.6.1.1).	
Le pH de la solution doit être égal à 7,2.	
B) MgSO ₄ ·7H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydrate):	22,50 g
Dissoudre et compléter le volume jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau (1.6.1.1).	
C) CaCl ₂ (chlorure de calcium):	27,50 g
Dissoudre et compléter le volume jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau (1.6.1.1).	
D) FeCl ₃ ·6H ₂ O [chlorure de fer (III) hexahydrate]:	0,25 g
Dissoudre et compléter le volume jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau (1.6.1.1).	

1.6.2. *Appareillage*

Appareillage de mesure de la DBO équipé de 6 fioles d'une contenance de 300 millilitres de chacune.

Fioles n° 1 et n° 2:

300 millilitres d'eau déionisée + 30 milligrammes de substance à examiner.

Fioles n° 3 et n° 4:

300 millilitres de milieu de culture de base + 9 milligrammes de boue activée (poids sec) + 30 milligrammes de substance à examiner.

Fiole n° 5:

300 millilitres de milieu de culture de base + 9 milligrammes de boue activée (poids sec) + 30 milligrammes d'aniline ou autre substance de référence.

Fiole n° 6:

300 millilitres de milieu de culture de base + 9 milligrammes de boue activée (poids sec).

1.6.3. *Préparation de l'inoculum*

1.6.3.1. *Boue activée*

Lieux de prélèvement des échantillons de boue: en principe, les échantillons de boue sont prélevés en au moins 10 endroits différents répartis sur tout le pays, principalement dans les zones où diverses substances chimiques sont susceptibles d'être utilisées et rejetées dans l'environnement.

Au Japon par exemple, la boue activée standard du Japanese Chemical Biotesting Centre est constituée d'un mélange d'échantillons prélevés aux endroits suivants:

- station d'épuration urbaine: trois stations situées au nord, au centre et au sud du Japon,
- station d'épuration industrielle: une station destinée au traitement des eaux usées en provenance d'industries chimiques,
- rivières: trois rivières situées au nord, au centre et au sud du Japon,
- lac: un lac situé au centre du Japon,
- mers: deux mers intérieures du Japon.

Périodicité des prélèvements de boue: en principe, les échantillons de boues doivent être prélevés quatre fois par an, en mars, en juin, en septembre et en décembre.

Méthode d'échantillonnage des boues:

- eaux d'égout: prélever 1 litre de boue recyclée à la station d'épuration,
- rivières, lacs et marais ou mers: prélever 1 litre de terre située à la surface de la plage et en contact avec l'atmosphère.

Préparation :

placer les boues en provenance des divers endroits dans un récipient, homogénéiser et laisser décanter. Enlever les matières flottantes étrangères et passer le liquide surnageant sur un papier-filtre n° 2. Ajuster le pH du filtrat à $7,0 \pm 1,0$ au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique, puis transvaser le filtrat dans un récipient d'incubation et le soumettre à une aération.

Culture :

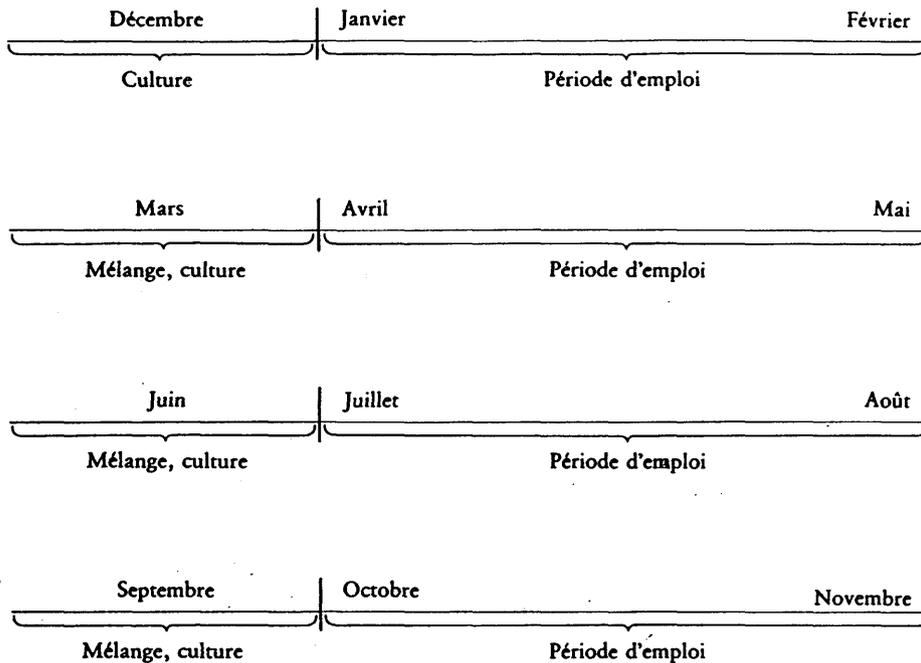
après environ 30 minutes d'aération, retirer environ un tiers du volume total du liquide surnageant. Ajouter un volume égal d'eau d'égout synthétique à 0,1 % (eau d'égout synthétique: dissoudre 1 gramme de glucose, 1 gramme de peptone et 1 gramme de monophosphate de potassium dans 1 litre d'eau, ajuster le pH de la solution à $7,0 \pm 1,0$ au moyen d'hydroxyde de sodium) au reste de liquide surnageant et aérer à nouveau le mélange. Répéter l'opération chaque jour. L'incubation se fait à 25 ± 2 °C.

Contrôle :

pour le contrôle de la culture, vérifier les éléments ci-après et procéder aux ajustements nécessaires:

- aspect du liquide surnageant: le liquide surnageant de la boue activée doit être d'aspect clair,
- propriétés de décantation de la boue activée: la boue activée en gros flocons doit avoir de bonnes propriétés de décantation,
- état de formation de la boue activée: au cas où on n'observerait pas de développement de flocons, il y a lieu d'accroître soit le volume d'eau d'égout synthétique à 0,1 %, soit la fréquence d'addition d'eau d'égout synthétique,
- le pH du liquide surnageant doit être égal à $7,0 \pm 1,0$,
- température: la température d'incubation de la boue activée est de 25 °C \pm 2 °C,
- degré d'aération: lors du remplacement du liquide surnageant par de l'eau d'égout synthétique, la suspension contenue dans le récipient de culture doit être suffisamment aérée, de façon à maintenir la concentration en oxygène dissous dans la solution à une valeur supérieure à 5 milligrammes par litre,
- microflore de la boue activée: l'observation de la boue activée au microscope ($\times 100$ à $\times 400$) doit permettre de déceler, outre les flocons, un certain nombre de protozoaires de différentes espèces,
- mélange de boues activées fraîches et anciennes: afin de conserver la même activité aux boues activées fraîches et anciennes, le filtrat du liquide surnageant d'une boue activée utilisée pour l'essai doit être mélangé en volume égal au filtrat du liquide surnageant d'une boue activée fraîchement recueillie, après quoi le mélange est soumis à l'incubation,
- contrôle de l'efficacité de la boue activée: vérifier périodiquement, c'est-à-dire au moins une fois tous les trois mois, l'efficacité de la boue activée au moyen de substances standards et en utilisant la méthode préconisée ci-après. On veillera particulièrement à contrôler l'activité de la boue ancienne lors du mélange d'échantillons de boues fraîches et anciennes.

Exemple de préparation d'échantillons de boues activées et période d'utilisation :



(et ainsi de suite).

1.6.4. Préparation du produit à examiner

Si le produit à examiner ne peut être solubilisé dans l'eau pour obtenir la concentration requise pour l'essai, il convient de le pulvériser aussi finement que possible.

1.6.5. Addition du produit à examiner et préparation en vue de l'essai

Prévoir les récipients d'essai ci-après et les amener à la température requise pour l'essai (voir point 1.6.2).

- 1) Deux récipients d'essai contenant de l'eau à laquelle on aura ajouté 100 milligrammes par litre de substance à examiner (récipients 1 et 2).
- 2) Deux récipients d'essai contenant le milieu de culture de base auquel on aura ajouté 100 milligrammes par litre de substance à examiner; au besoin, ajuster le pH de cette solution à 7 avant l'ensemencement de boue activée (récipients 3 et 4).
- 3) Un récipient d'essai contenant le milieu de culture de base auquel on aura ajouté 100 milligrammes par litre d'aniline ou de toute autre substance de référence (récipient 5).
- 4) Un récipient d'essai témoin contenant uniquement le milieu de culture de base (récipient 6).

1.6.5.1. Ensemencement de la boue activée

Ajouter l'inoculum dans les récipients d'essai 3, 4, 5 et 6 ci-avant de manière à ce que la concentration en matières en suspension définies par les normes industrielles japonaises (3) par exemple, soit égale à 30 milligrammes par litre.

1.6.5.2. Conditions d'essai

Concentration en produits à examiner: 100 milligrammes par litre.

Concentration des boues activées: 30 milligrammes par litre.

Température d'essai: 20 à 25 °C.

Durée de l'essai: 28 jours.

Effectuer l'essai dans l'obscurité. Vérifier quotidiennement la température ainsi que les changements de couleur intervenant dans le récipient d'incubation.

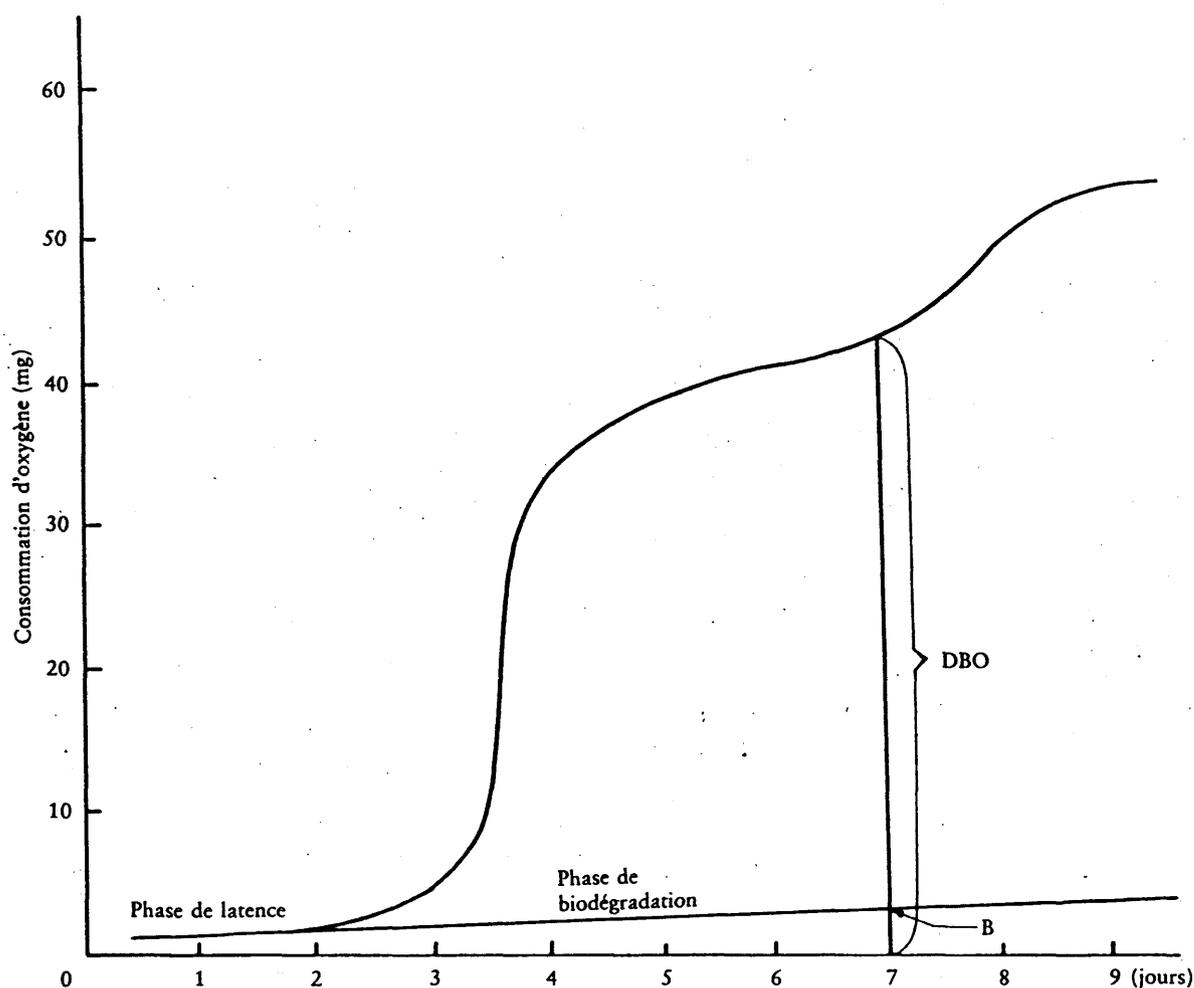
Homogénéiser les solutions d'essai au moyen d'un agitateur mécanique.

1.6.6. *Mode opératoire*

La courbe d'évolution de la DBO est enregistrée de manière continue pendant 28 jours (voir figure). Après 28 jours d'essai, mesurer le pH et la concentration de produits chimiques résiduels et intermédiaires contenus dans les récipients d'essai.

Figure

Courbe de DBO de l'aniline



Analyser également les produits à examiner contenus dans le récipient d'essai sans boue activée, de manière à déceler tout changement intervenant dans le produit examiné pendant la période d'essai ou toute perte du produit original par évaporation ou adsorption par les parois des récipients d'essai, etc.

1.6.7. *Appareillage analytique*

Si la substance à examiner est soluble dans l'eau, il convient également de déterminer la quantité résiduelle de carbone organique total à la fin de l'essai.

- a) En cas d'utilisation d'un appareillage pour déterminer le carbone organique total:
 prélever 10 millilitres de solution à examiner dans le récipient d'essai et la centrifuger à 3 000 grammes pendant 5 minutes. Mesurer ensuite la quantité résiduelle de carbone organique total dans le liquide surnageant au moyen d'un appareillage à déterminer le carbone organique total.
- b) En cas d'utilisation d'autres appareillages:
 extraire la substance à examiner au moyen d'un solvant adéquat en opérant sur le contenu total du récipient d'essai et, après un prétraitement convenable tel que la concentration, déterminer la quantité résiduelle de substance à examiner au moyen d'un instrument d'analyse (chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse, spectrophotométrie, etc.).

Pour les produits volatils, le bain thermostaté de l'appareil de mesure de la DBO doit être refroidi à 10 °C et maintenu à cette température pendant au moins 30 minutes, afin d'empêcher l'évaporation. Procéder ensuite aux analyses a) et b).

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

2.1. Expression des résultats

Les méthodes de calcul du taux de dégradation à partir de la consommation d'oxygène et à partir des résultats de l'analyse directe sont exposées au point 1.2.

2.2. Évaluation des résultats

La demande théorique en oxygène peut être calculée comme indiqué à l'appendice 2 ou en suivant la procédure MITI originale:

Élément	Forme oxydée
C	CO ₂
H	H ₂ O
N	NO ₂
S	SO ₂
X (halogène)	X

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit comporter si possible les indications suivantes:

- informations sur les produits chimiques à examiner: nom, structure, poids moléculaire, pureté, nature des impuretés, propriétés physico-chimiques, identification de la substance,
- conditions de l'essai,
- inocula: lieux de prélèvement et concentration des boues activées,
- substance à examiner: concentration,
- durée de l'essai,
- température d'essai,
- technique analytique:
 - prétraitement,
 - performances analytiques des instruments,
 - efficacité de l'analyse,
 - identification des produits intermédiaires,

- résultats:
 - courbes de biodégradation (contrôle de l'activité de l'inoculum + courbe de la substance)
 - DBO (mg)
 - B (mg)
 - Sa (mg)
 - Sb (mg)
 - DThO (mg)
 - taux de dégradation obtenu par détermination de la DBO,
 - taux de dégradation obtenu par analyse chimique,
 - chromatogrammes ou spectres des produits d'essai obtenus et utilisés pour l'analyse
- preuve de validité (voir point 1.3)

3.2. Interprétation des résultats

Il convient de vérifier si les substances ne contiennent pas d'azote susceptible d'influer sur les résultats.

Si le taux de récupération de Sb se révèle être de l'ordre de 10 % ou inférieur, cela met en évidence des problèmes analytiques ou une hydrolyse par exemple; en pareil cas, il convient d'être particulièrement prudent dans l'interprétation.

Du fait de la rigueur de l'essai, un résultat peu élevé ne signifie pas nécessairement que la substance soumise à l'essai n'est pas biodégradable en milieu naturel, mais indique qu'il faudra procéder à d'autres essais pour en faire la preuve.

Les produits à examiner pour lesquels les résultats du présent essai indiquent une forte consommation d'oxygène doivent être considérés comme facilement biodégradables, à condition que ce niveau soit atteint dans le délai de 10 jours, à compter du jour où le niveau de biodégradation observé dépasse pour la première fois 10 %.

4. RÉFÉRENCES

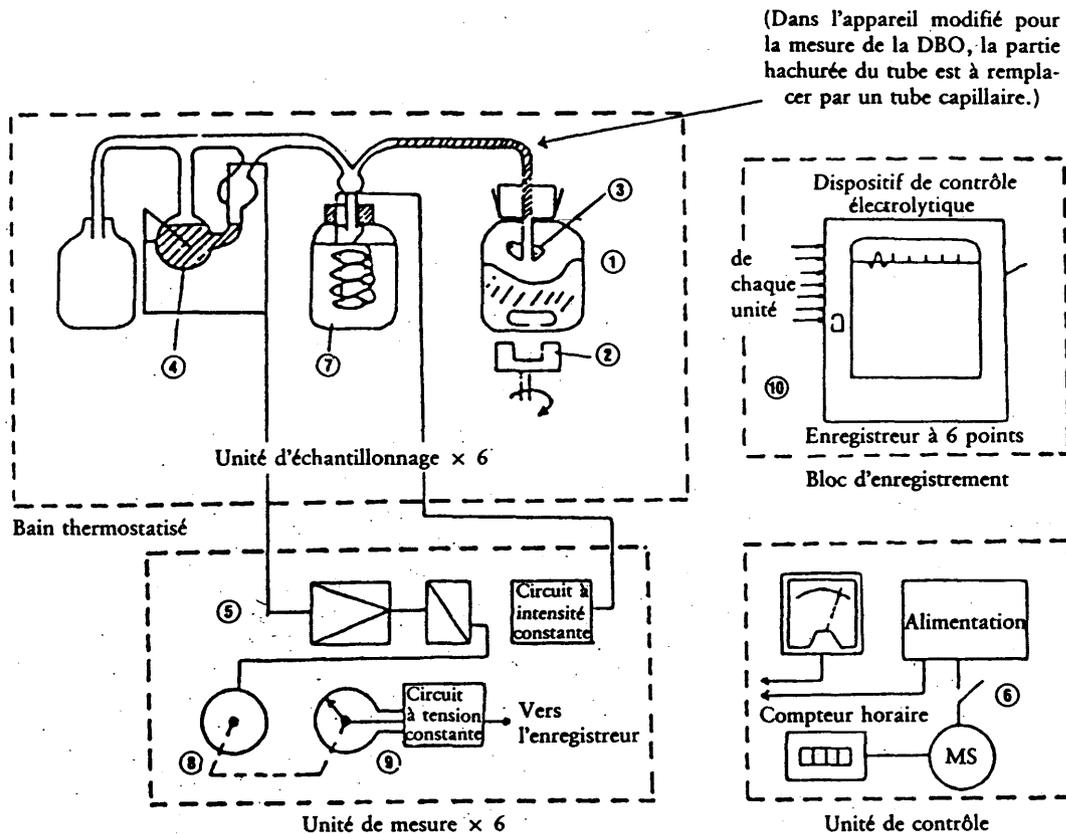
- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 301C. Decision of the Council C(81) 30, Final.
- (2) Biodegradability and bioaccumulation test of chemical substances (C-5/98/JAP), 1978.
- (3) The chemical substances control law in Japan (Chemical Products Safety Division, Basic Industries Bureau, MITI) (C-2/78/JAP), 1978.
- (4) The biodegradability and bioaccumulation of new and existing chemical substances, 5, 8 (C-3/78/JAP), 1978.

Appendice 1

Principe de fonctionnement de l'appareil à mesurer la consommation en oxygène en circuit fermé

La mesure de l'oxygène consommé par les micro-organismes peut être faite au moyen d'un procédé d'analyse électrochimique (coulométrie).

Schéma de principe de l'appareil



Le milieu contenu dans le flacon d'incubation (1) est homogénéisé au moyen de l'agitateur magnétique (2). À mesure que la réaction progresse, l'oxygène dissous dans le liquide est consommé. L'oxygène (O_2) maintenu dans le flacon d'incubation est dissous dans le liquide, et se transforme en CO_2 .

Lorsque le CO_2 est absorbé par la chaux sodée (3), la pression partielle due à l'oxygène dans le flacon et la pression totale diminuent.

La baisse de pression est détectée et convertie en signal électrique par le manomètre à électrode (4), et ce signal est amplifié par l'amplificateur (5), pour actionner le relais (6) ce qui provoque la mise en marche du moteur synchrone (8). Simultanément, sous l'action d'un courant à intensité constante, de l'oxygène est produit par électrolyse à partir d'une solution de cuivre dans de l'acide sulfurique, contenue dans le flacon d'électrolyse (7).

Cet oxygène est envoyé dans le flacon d'incubation et le rétablissement de la pression ainsi obtenu est détecté par le manomètre, ce qui a pour effet de déconnecter le circuit et d'arrêter le moteur électrolytique et synchrone.

L'espace situé au-dessus du liquide dans le flacon d'incubation est maintenu à pression d'oxygène constante et la quantité d'oxygène produite par électrolyse. Cette dernière quantité étant à son tour proportionnelle à la durée de l'électrolyse, le courant électrolytique est constant. Par conséquent, l'angle de rotation du moteur synchrone (9) est transformé en signal mV au moyen d'un potentiomètre d'interverrouillage, ce qui se traduit par l'indication de la quantité d'oxygène consommée sur l'enregistreur (10).

Appendice 2

Calcul de la demande biochimique théorique en oxygène

La DThO de la substance $C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s$, de poids moléculaire PM est calculée selon la formule suivante :

$$DThO_{NH_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

Ce calcul implique que C est minéralisé en CO_2 , H en H_2O , P en P_2O_5 , et Na en Na_2O . L'halogène est éliminé sous forme d'halogénure et l'azote sous forme d'ammoniac.

Exemple: Glucose $C_6H_{12}O_6$, PM = 180.

$$DThO = \frac{16 \left(2 \cdot 6 + \frac{1}{2} \cdot 12 - 6 \right)}{180} = 1,07 \text{ mg } O_2/\text{mg glucose.}$$

Les poids moléculaires des sels autres que ceux des métaux alcalins sont calculés dans l'hypothèse où les sels ont été hydrolysés. Le soufre est supposé oxydé à l'état de + 6.

Exemple: n-Alkylbenzènesulfonate de sodium $C_{11}H_{22}SO_3Na$, PM = 348.

$$DThO = \frac{16 \left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3 \right)}{348} = 2,34 \text{ mg } O_2/\text{mg de substance.}$$

Si la substance contient de l'azote, celui-ci peut être éliminé sous forme d'ammoniac, de nitrite ou de nitrate, selon les différentes demandes biochimiques théoriques en oxygène.

$$DThO_{NO_2} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl) + 3s + \frac{3}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left[2c + \frac{1}{2} (h - cl) + 3s + \frac{5}{2}n + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o \right]}{PM}$$

Si une formation complète de nitrate avait été observée par analyse dans le cas d'une amine secondaire:

$(C_{12}H_{25})_2NH$; PM = 353

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 \left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2} \right)}{353} = 3,44 \text{ mg } O_2/\text{mg de substance.}$$

Appendice 3

Dégradation biotique: essai MITI modifié (bulletin)

Laboratoire:

Directeur des études:

Date du début de l'essai: Expérience n°:

Substance d'essai:

Composition chimique:

Analyse:

DThO ou DCO de la substance à tester:

Inoculum:

Lieu d'échantillonnage:

Concentration:

Résultat de l'essai

$$\dots\dots\dots \% \text{ dégradation} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{ThOD}} \times 100 \% \text{ après 28 jours}$$

ou

$$\dots\dots\dots \% \text{ dégradation} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{COD}} \times 100 \% \text{ après 28 jours}$$

$$\dots\dots\dots \% \text{ dégradation} = \frac{\text{Sb} - \text{Sa}}{\text{Sb}} \times 100 \% \text{ après 28 jours}$$

Validation du résultat

Contrôle chimique:

Résultat: % dégradation après 28 jours

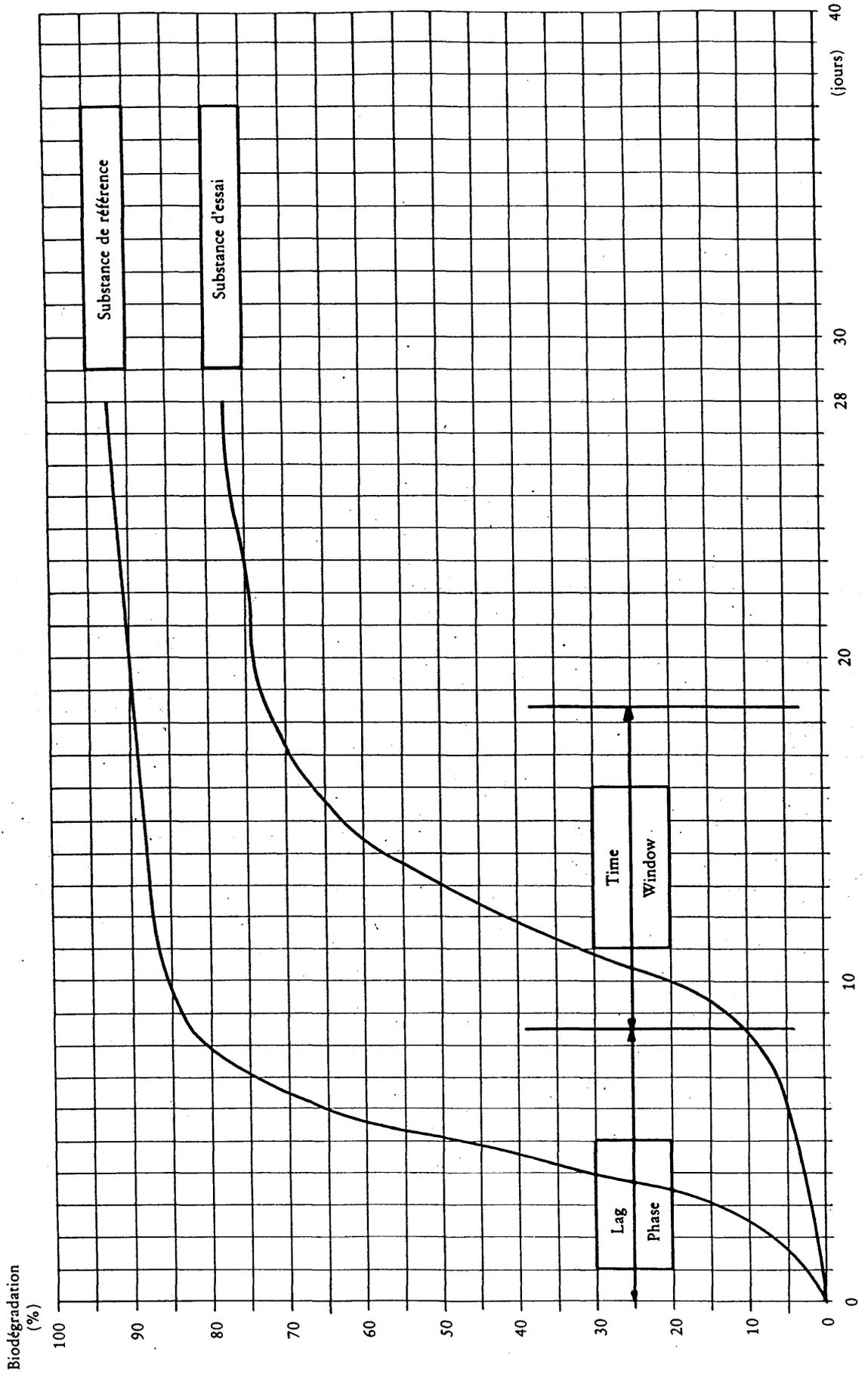
Expérience de référence n°:

Remarques

Appendice 4

Essai MITI modifié

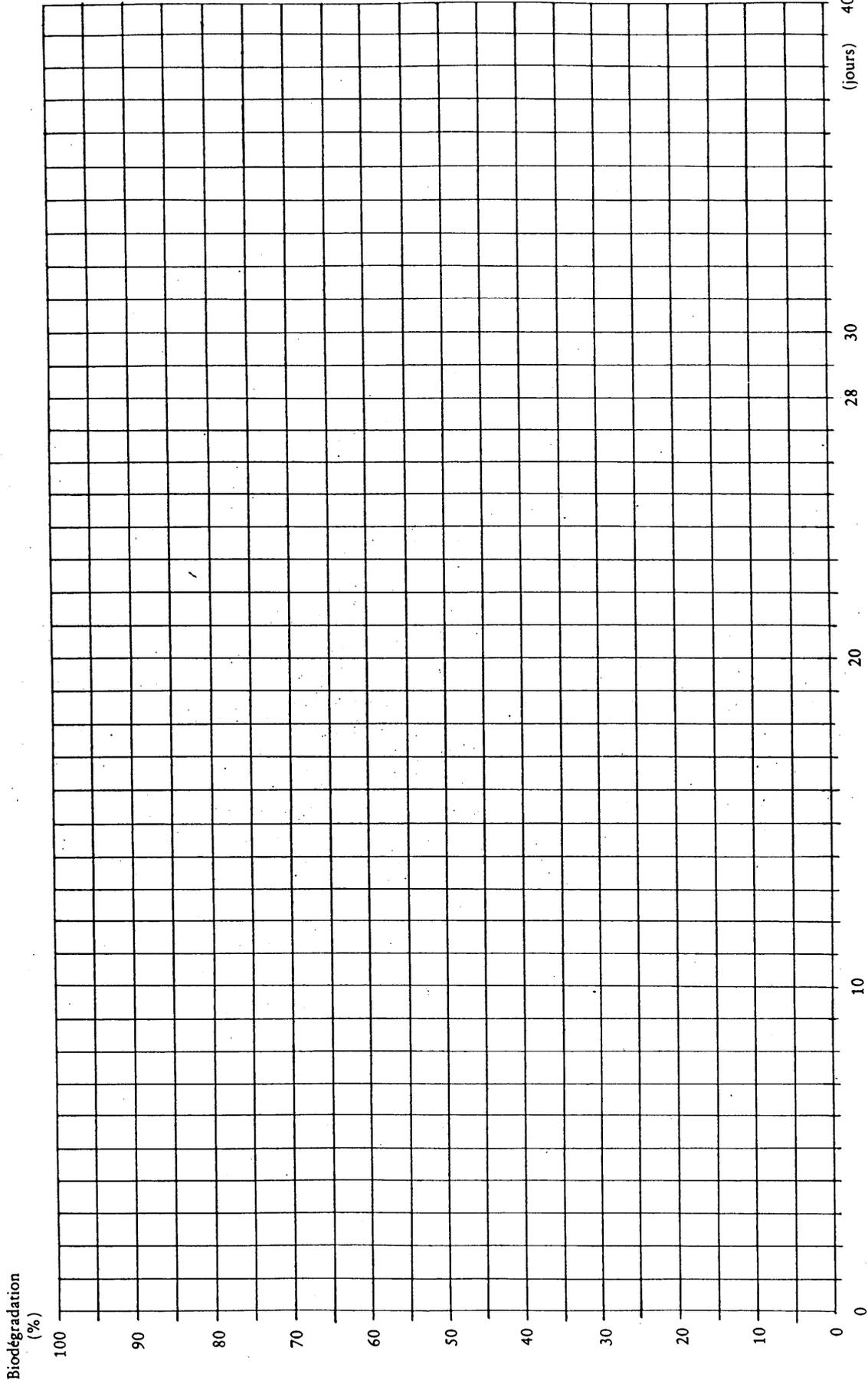
Organisme responsable de l'essai: Substance à tester: Expérience n°:



Essai MITI modifié

Organisme responsable de l'essai: Expérience n°:

Substance à tester:



C. 8. DÉGRADATION: DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La méthode a pour objet la mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) des substances organiques, solides ou liquides.

Les données fournies par cet essai portent sur les composés hydrosolubles; toutefois, les composés volatils et les composés à faible hydrosolubilité peuvent également être testés, du moins en principe.

La méthode est applicable uniquement aux substances organiques, non inhibitrices vis-à-vis des bactéries à la concentration utilisée au cours du test. Si la substance d'essai n'est pas soluble à la concentration d'essai, des procédures particulières telles que le recours à la dispersion ultrasonique pourraient s'imposer, afin d'obtenir une bonne dispersion de la substance.

Des données sur la toxicité de la substance chimique peuvent être utiles pour l'interprétation de résultats peu probants et pour le choix de concentrations d'essai appropriées.

1.2. Définition et unités

La DBO est définie comme la masse d'oxygène dissoute nécessaire pour assurer dans des conditions définies l'oxydation biochimique d'un volume défini d'une solution de la substance soumise aux essais.

Les résultats sont exprimés en grammes de DBO par gramme de substance soumise à essai.

1.3. Substance de référence

Des substances de référence ne peuvent être recommandées.

L'utilisation d'une substance chimique témoin appropriée pour vérifier l'activité de l'inoculum est souhaitable.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Ensemencer avec des micro-organismes et incuber à une température ambiante constante, définie, dans l'obscurité, une quantité prédéterminée de substance, dissoute ou dispersée en milieu aéré, approprié.

La DBO est déterminée par la différence entre la teneur en oxygène dissous au début et à la fin de l'essai. La durée de l'essai est d'au moins cinq jours et ne dépassera pas 28 jours.

Un témoin doit être constitué par un essai parallèle ne contenant pas de substance soumise à l'essai.

1.5. Critères de qualité

La détermination de la DBO ne peut être considérée comme représentant valablement la biodégradabilité d'une substance et ne constitue qu'un essai de sélection.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance, afin d'obtenir une concentration de DBO compatible avec la méthode utilisée. La DBO est alors déterminée par application de méthode normalisée, nationale, appropriée, mais de préférence selon une méthode internationale, qui reste à définir.

2. ÉVALUATION DES DONNÉES

La DBO contenue dans la solution préliminaire est calculée suivant la méthode normalisée choisie et convertie en grammes de DBO par gramme de substance d'essai.

3. PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

La méthode utilisée doit être indiquée.

La demande biochimique en oxygène doit être la moyenne d'au moins trois mesures valables.

Toutes les données et observations pertinentes aidant à l'interprétation des résultats doivent être consignées, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique, les effets toxiques et la composition de la substance, susceptibles d'affecter les résultats.

L'utilisation de tout additif inhibiteur de la nitrification biologique doit être consignée.

4. RÉFÉRENCES

List of standardized methods, for example:

NF T 90—103 Determination of the Biochemical Oxygen Demand

NBN 407 Biochemical Oxygen Demand

NEN 3235 5.4 Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The Determination of biochemical Oxygen Demand, 1981 (Methods for the examination of Water and Associated Materials, HMSO, London).

C. 9. DÉGRADATION: DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGÈNE

1. MÉTHODE

1.1. Introduction

La méthode a pour objet la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) des substances organiques solides ou liquides, par application de tout mode opératoire normalisé, dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le fait de disposer de données sur la formule de la substance facilitera la réalisation de cet essai ainsi que l'interprétation des résultats obtenus (par exemple sels halogénés, sels ferreux de composés organiques, composés organochlorés).

1.2. Définitions et unités

La demande chimique en oxygène est la mesure de l'oxydabilité d'une substance, définie comme la quantité d'oxygène d'un réactif oxydant, consommé par la substance dans des conditions de laboratoire déterminées.

Le résultat est exprimé en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

1.3. Substances de référence

L'emploi de substances de référence n'est pas requis dans tous les cas où l'on analyse une nouvelle substance. Ces substances de référence doivent permettre d'étalonner périodiquement la méthode et de favoriser la comparaison des résultats en cas d'application de méthodes différentes.

1.4. Principe de la méthode d'essai

Une quantité déterminée de substance dissoute ou dispersée dans de l'eau, est oxydée à l'aide de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique concentré (le catalyseur étant du sulfate d'argent) à chaud et à reflux pendant deux heures. Le bichromate résiduel est dosé par titration à l'aide de sulfate ferreux et d'ammonium titré.

Au cas où les substances contiennent du chlore, ajouter du sulfate mercurique pour atténuer l'interférence des chlorures.

1.5. Critères de qualité

En raison des conditions arbitraires de détermination de la DCO, cette dernière doit être considérée davantage comme un « indicateur Redox » que comme une évaluation de la substance organique.

Les chlorures peuvent interférer au cours de cet essai; d'autres substances minérales réductrices ou oxydantes peuvent également influencer la détermination de la DCO.

Certains composés cycliques ne sont pas totalement oxydés lors de l'essai.

1.6. Description de la méthode d'essai

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance pour aboutir à une DCO de 250 à 600 milligrammes par litre.

Remarque:

lorsqu'on a affaire à des substances peu solubles et non dispersables, peser une quantité de substance finement pulvérisée ou à l'état liquide, correspondant à environ 5 milligrammes de DCO, et l'introduire dans l'appareil d'expérimentation avec addition d'eau.

Déterminer ensuite la DCO par application de toute méthode nationale normalisée, adéquate, en attendant qu'une méthode normalisée internationale soit publiée, à laquelle il conviendrait dès lors d'accorder la préférence.

2. **ÉVALUATION DES DONNÉES**

Calculer la DCO contenue dans le flacon expérimental, suivant la méthode normalisée choisie, et convertir en grammes de DCO par gramme de substance d'essai.

3. **PRÉSENTATION DES RÉSULTATS**

La méthode de référence utilisée doit être indiquée.

La demande chimique en oxygène sera la moyenne d'au moins trois mesures. Il sera fait état de toutes données et observations présentant de l'intérêt pour l'interprétation des résultats, notamment en ce qui concerne les impuretés, l'état physique et les propriétés spécifiques de la substance (si elles sont connues) susceptibles d'affecter les résultats.

Mentionner si l'on a fait usage de sulfate mercurique pour réduire l'interférence des chlorures.

4. **RÉFÉRENCES**

Exemples de méthodes normalisées:

NBN T 91 — 201	Determination of the Chemical Oxygen Demand
ISBN O 11 7512494	Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters
NF T 90 — 101	Détermination de la demande chimique en oxygène
DS 217 = Water Analysis	Determination of the Chemical Oxygen Demand
DIN 38409 — H — 41	Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l
NEN 3235 5.3	Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik
ISO DP 6060	Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods

C. 10. DÉGRADATION ABIOTIQUE : HYDROLYSE EN FONCTION DU pH

1. MÉTHODE

Cette méthode est basée sur celle décrite dans « les lignes directrices » de l'OCDE (1).

1.1. Introduction

L'hydrolyse est une réaction importante contrôlant la dégradation abiotique. Cette réaction est particulièrement adaptée dans des substances peu biodégradables, et elle peut influencer la persistance d'une substance dans l'environnement.

La plupart des réactions d'hydrolyse sont de *pseudo*-premier ordre et, pour cela, les « temps de demi-vie » sont indépendants de la concentration. Cela permet habituellement d'extrapoler les résultats obtenus à des concentrations de laboratoire aux conditions de l'environnement.

De plus, plusieurs exemples ont été cités (2), montrant un accord satisfaisant entre les résultats trouvés dans l'eau pure et l'eau naturelle, et cela pour plusieurs types de produits chimiques.

Il est utile, pour réaliser cet essai, de disposer de données préliminaires sur la tension de vapeur de la substance.

Cette méthode est seulement applicable aux substances solubles. Les impuretés vont, en général, influencer les résultats.

Le comportement hydrolytique des substances chimiques devrait être étudié à des valeurs de pH habituellement rencontrées dans l'environnement (pH 4 à 9).

1.2. Définitions et unités

L'hydrolyse se rapporte à la réaction d'un produit chimique RX avec l'eau. Cette réaction peut être représentée par un échange caractéristique du radical X avec OH:



La vitesse à laquelle la concentration de RX décroît est donnée par la relation:

$$\text{vitesse} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \cdot [\text{RX}] \quad [2]$$

Par le fait que l'eau est en grand excès par rapport à la substance chimique, ce type de réaction est habituellement décrit comme étant une réaction de *pseudo*-premier ordre au cours de laquelle la constante de vitesse observée est donnée par la relation:

$$k_{\text{obs}} = k \cdot [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Cette constante peut être déterminée pour une valeur de pH et une température T, en utilisant l'expression:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

t = temps

C₀ = la concentration de la substance au temps 0

C_t = la concentration de la substance au temps t

2,303 = facteur de conversion entre les logarithmes népériens et ceux en base 10.

Les concentrations sont exprimées en g/l ou en mole/l.
L'unité de la constante k_{obs} est le (temps)⁻¹.

Le « temps de demi-vie » $t_{1/2}$ est défini comme le temps nécessaire pour réduire de 50 % la concentration de la substance chimique à tester, c'est-à-dire :

$$C_t = 1/2 \cdot C_0 \quad [5]$$

De l'expression [4] et [5], on peut démontrer que

$$t_{1/2} = 0,693/k_{obs} \quad [6]$$

1.3. Substances de référence

Il n'est pas nécessaire d'utiliser des substances de référence dans tous les cas lorsque l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir essentiellement à contrôler de temps à autre l'efficacité de la méthode et à permettre la comparaison des résultats lorsqu'une autre méthode est utilisée.

L'acide acétylalicylique (Aspirine) et le 0,0-diéthyl 0-2 isopropyl-4-méthyl — 6 pyrimidyl thiophosphate (Dimpylate, Diazinon) ont été utilisés comme substances de référence (1).

1.4. Principe de la méthode

La substance est dissoute dans l'eau à une faible concentration, le pH et la température sont contrôlés.

La diminution de la concentration de la substance au cours du temps est suivie par toute procédure analytique appropriée.

Les logarithmes des concentrations de la substance au cours du temps sont reportés sur un graphique et, si cela donne une droite, la constante de vitesse de premier ordre peut être obtenue par la pente de cette droite (voir point 2).

Lorsqu'il n'est pas possible de déterminer immédiatement une constante de vitesse pour une température particulière, il est normalement possible d'estimer la valeur de cette constante, à l'aide de la relation d'Arrhenius, qui donne la dépendance de la constante de vitesse par rapport à la température.

Du graphe linéaire du logarithme de la constante de vitesse telle que déterminée à température appropriée en fonction de l'inverse de la température absolue (k), il est possible d'extrapoler la valeur de la constante de vitesse qui n'était pas obtenue dans le premier cas.

1.5. Critère de qualité

La référence (2) rapporte que des mesures de constante de vitesse d'hydrolyse pour 13 classes de structures organiques peuvent être de grande précision.

La répétabilité dépend en particulier du contrôle de la valeur du pH, de la concentration en oxygène dissous et peut être influencée par la présence de micro-organismes.

1.6. Description de la méthode

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions tampons

Le test est effectué à trois valeurs de pH: 4,0, 7,0 et 9,0.

À cette fin, des solutions tampons devraient être préparées en utilisant des réactifs chimiques de pureté analytique et de l'eau distillée ou désionisée stérile.

Quelques exemples de solutions tampons sont présentés à l'appendice.

La solution tampon utilisée peut influencer la vitesse d'hydrolyse; si cela s'avère le cas, une autre solution tampon doit être utilisée. L'utilisation de tampons borate ou acétate est recommandée dans la référence (2) au lieu des phosphates.

Si la valeur du pH des solutions tampons est inconnue à la température de l'essai, elle doit être déterminée à l'aide d'un pH-mètre calibré à la température choisie avec une précision de $\pm 0,1$ unité de pH.

1.6.1.2. Solutions d'essai

La substance d'essai doit être dissoute dans le tampon choisi et la concentration ne devrait pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation.

L'utilisation de solvants organiques miscibles dans l'eau est seulement recommandée pour des substances ayant une faible solubilité dans l'eau. La quantité du solvant devrait être inférieure à 1 % et ne devrait pas interférer avec le processus hydrolytique.

1.6.2. Appareillage

Des fioles fermées en verre devraient être employées, mais l'utilisation de graisse sur les rodages est à éviter.

Si la substance ou le tampon utilisés sont volatiles, ou si l'essai est mené à hautes températures, on préférera des tubes scellés ou fermés et remplis le plus complètement possible.

1.6.3. Méthode analytique

La méthode analytique dépendra de la nature de la substance d'essai et sera suffisamment sensible et spécifique pour déterminer une diminution de 10 % de la concentration initiale.

La méthode doit être spécifique pour permettre la détermination de la substance d'essai aux concentrations utilisées au cours de l'essai et peut consister à combiner quelques méthodes analytiques appropriées.

1.6.4. Conditions de l'essai

Les essais seront menés en utilisant une enceinte thermostatique contrôlée ou un bain à température constante établi à $\pm 0,5$ °C de la température choisie. La température sera maintenue et mesurée à $\pm 0,1$ °C. Les interférences photolytiques devraient être évitées par des moyens appropriés.

Toutes les précautions adéquates devraient être prises pour éliminer l'oxygène dissous (par exemple, en barbotant de l'azote ou de l'argon pendant 5 minutes avant de préparer les solutions).

1.6.5. Procédure d'essai

1.6.5.1. Test préliminaire

Pour toutes les substances, un essai préliminaire devrait être conduit à $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ à 3 valeurs de pH: 4,0, 7,0 et 9,0.

On prendra un nombre de mesures suffisantes, de façon à pouvoir estimer si, pour chaque valeur de pH et à 50 °C , le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est inférieur à 2,4 heures ou si moins de 10 % d'hydrolyse est observé après 5 jours. [On peut estimer que ces valeurs correspondent respectivement à des temps de demi-vie inférieurs à 1 jour ou supérieurs à 1 an dans des conditions plus représentatives que l'environnement (25 °C).]

Si le test préliminaire démontre que 50 % de la substance d'essai ou plus ont été hydrolysés en 2,4 heures à 50 °C ou que moins de 10 % ont été hydrolysés après 5 jours pour chaque valeur de pH (4, 7 et 9), il est inutile de poursuivre les essais.

Dans d'autres cas et pour des valeurs de pH pour lesquelles ces conditions n'ont pas été remplies, l'essai n° 1 est effectué.

1.6.5.2. Essai n° 1

L'essai n° 1 est mené à une température, de préférence à $50\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, si possible dans des conditions stériles aux valeurs de pH pour lesquelles les essais préliminaires ont montré le besoin d'essais supplémentaires.

Un nombre suffisant d'échantillons (pas moins de 4) devrait être choisi afin de couvrir un intervalle de 20 à 70 % d'hydrolyse pour déterminer le comportement de *pseudo*-premier ordre aux valeurs de pH spécifiques.

Pour chaque valeur de pH pour laquelle l'essai n° 1 a été effectué, l'ordre de la réaction est déterminé.

Estimation de la constante de vitesse à 25 °C

La décision d'un choix de procédé expérimental dépend du fait qu'il soit possible de conclure de l'essai n° 1 que la réaction est ou n'est pas de *pseudo*-premier ordre.

S'il n'est pas possible de déterminer avec certitude au cours de l'essai n° 1 si la réaction est du *pseudo*-premier ordre, les expériences doivent être poursuivies, telles que décrites dans l'essai n° 2.

Si la détermination du *pseudo*-premier ordre de l'essai n° 1 est fiable, les expériences doivent être poursuivies selon la description de l'essai n° 3 [ou bien, il est possible, dans certaines circonstances, de calculer la constante de vitesse à 25 °C sur base des constantes déterminées à 50 °C , calculées en utilisant les résultats de l'essai n° 1 (voir point 3.2).

1.6.5.3. Essai n° 2

Cet essai est effectué pour chaque pH pour lequel il a été établi dans l'essai n° 1 qu'il était nécessaire de poursuivre les expériences :

- soit à une température, choisie inférieure à 40 °C ,
- ou à deux températures, au-dessus de 50 °C , écartées entre elles d'au moins 10 °C .

Pour chaque valeur de pH et température pour lesquelles l'essai n° 2 est effectué, au moins six points espacés de manière appropriée sont mesurés de telle sorte que les pourcentages d'hydrolyse sont dans l'intervalle de 20 à 70 %.

Pour une valeur de pH et une température, une double détermination est effectuée. Lorsque l'essai n° 2 est fait à deux températures au-dessus de 50 °C , la double détermination est effectuée de préférence à la plus basse des deux températures.

Pour chaque valeur de pH et température pour lesquelles l'essai n° 2 est effectué, une estimation graphique du temps de demi-vie ($t_{1/2}$) sera donnée, lorsque cela est possible.

1.6.5.4. Essai n° 3

Cet essai est effectué pour chaque valeur de pH pour laquelle les résultats de l'essai n° 1 en ont montré la nécessité :

- soit à une température, choisie inférieure à 40 °C,
- ou à deux températures au-dessus de 50 °C, écartées entre elles d'au moins 10 °C.

Pour chaque valeur de pH et température pour lesquelles l'essai n° 3 est effectué, trois points de détermination sont choisis, le premier au temps 0 et les deuxième et troisième lorsque les pourcentages d'hydrolyse sont supérieurs à 30 % ; la constante k_{obs} et $t_{1/2}$ devraient être calculés.

2. DONNÉES

Dans le cas d'un comportement de *pseudo*-premier ordre les valeurs de k_{obs} pour chaque valeur de pH et chaque température des essais peuvent être obtenus du graphique des logarithmes des concentrations en fonction du temps, en utilisant l'expression :

$$k_{obs} = - \text{pente} \times 2,303$$

De plus, $t_{1/2}$ peut être calculé selon l'équation [6]. Estimer $k_{25\text{ °C}}$ en appliquant l'équation d'Arrhenius lorsque c'est approprié.

Dans le cas où le comportement n'est pas de *pseudo*-premier ordre, voir point 3.1.

3. PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

3.1. Le procès-verbal d'essai devrait si possible comporter les points suivants :

- les spécifications de la substance essayée,
- tout résultat obtenu avec des substances de référence,
- le principe et la description complète de la méthode analytique employée,
- pour chaque essai : les températures, la valeur du pH, la composition du tampon et la table des points expérimentaux concentration-temps,
- dans le cas des réactions de *pseudo*-premier ordre, les valeurs de k_{obs} , du $t_{1/2}$ et leurs méthodes de calcul,
- dans le cas d'une réaction qui n'est pas du *pseudo*-premier ordre, établir le graphique des logarithmes des concentrations en fonction du temps,
- toute information et observation nécessaire à l'interprétation des résultats.

3.2. Interprétation des résultats

Il est parfois possible de calculer des valeurs acceptables de la constante de vitesse (à 25 °C) de substances d'essai, à condition que des valeurs d'énergie d'activation pour des homologues de la substance chimique existent déjà et pour autant qu'il puisse être raisonnablement estimé que l'énergie d'activation de la substance d'essai soit du même ordre de grandeur.

4. RÉFÉRENCES

(1) OCDE, Paris, 1981, Test guideline 111 — Décision du Conseil C(81)30 F.

(2) OCDE, Paris, 1981, Test guideline 111 — Décision du Conseil C(81)30 F — référence (2).

Appendice

Mélange tampons

A. CLARK ET LUBS

Les valeurs de pH indiquées ci-avant ont été calculées à partir des mesures potentielles utilisant les équations standards de Sørensen (1909).

Les valeurs réelles de pH sont de 0,04 unité plus élevées que les valeurs.

Composition

	<i>pH</i>
0,1 M de phtalate de potassium hydrogène + 0,1 N HCl à 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml de phtalate, compléter à 100 ml	3,8
0,1 M de phtalate de potassium hydrogène + 0,1 N NaOH à 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phtalate, compléter à 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phtalate, compléter à 100 ml	4,2
0,1 M de phosphate monopotassique + 0,1 N NaOH à 20 °C	
23,45 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de phosphate, compléter à 100 ml	6,8
29,63 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de phosphate, compléter à 100 ml	7,0
35,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de phosphate, compléter à 100 ml	7,2
0,1 M H ₃ BO ₃ dans 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH à 20 °C	
16,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	8,8
21,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	9,0
26,70 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF ET VLEESCHOUWER

Composition

	<i>pH</i>
0,1 M de citrate monopotassique et 0,1 N NaOH à 18 °C (ajouter un cristal tenu de thymol ou quelques milligrammes d'iodure mercurique pour éviter la croissance des moisissures).	
2,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	3,8
9,00 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	4,0
16,30 ml de 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Composition		pH			
ml de borax	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M borax + 0,1 N NaOH

Composition		pH			
ml de borax	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12