

BELGISCH STAATSBLAD

MONITEUR BELGE

Prijs van een jaarabonnement :

België : F 4 260; buitenland : F 17 283.

Prijs per nummer : F 10 per vel van acht bladzijden.
Voor abonnementen en voor verkoop per nummer kan
U terecht bij het Bestuur van Belgisch Staatsblad,
Leuvenseweg 40-42, 1000 Brussel.
Telefoon 02/552 22 11.



Prix de l'abonnement annuel :

Belgique : F 4 260; étranger : F 17 283.

Prix au numéro : F 10 par feuille de huit pages.
Pour les abonnements et la vente au numéro, prière de
s'adresser à la Direction du Moniteur belge,
rue de Louvain 40-42, 1000 Bruxelles.
Téléphone 02/552 22 11.

168e JAARGANG

N. 60

168e ANNEE

DONDERDAG 26 MAART 1998
TWEEDE EDITIE

JEUDI 26 MARS 1998
DEUXIEME EDITION

WETTEN, DECRETEN, ORDONNANTIES EN VERORDENINGEN LOIS, DECRETS, ORDONNANCES ET REGLEMENTS

MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN, VOLKSGEZONDHEID EN
LEEFMILIEU, MINISTERIE VAN ECONOMISCHE ZAKEN,
MINISTERIE VAN BINNENLANDSE ZAKEN, MINISTERIE VAN
TEWERKSTELLING EN ARBEID EN MINISTERIE VAN MID-
DENSTAND EN LANDBOUW

N. 98 — 770

[S - C - 97/22891]

13 NOVEMBER 1997. — Koninklijk besluit tot wijziging van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu

ALBERT II, Koning der Belgen,
Aan allen die nu zijn en hierna wezen zullen, Onze Groet.

Gelet op de wet van 24 februari 1921 betreffende het verhandelen van giftstoffen, slaapmiddelen en verdovende middelen, ontsmettingsstoffen en antiseptica, inzonderheid op artikel 1, gewijzigd bij de wetten van 11 maart 1958, 1 juli 1976 en 14 juli 1994;

Gelet op de wet van 4 augustus 1996 betreffende het welzijn van de werknemers bij de uitvoering van hun werk;

Gelet op de wet van 28 mei 1956 betreffende ontplofbare en voor deflagratie vatbare stoffen en mengsels en de daarmee geladen tuigen;

Gelet op de wet van 11 juli 1969 betreffende de bestrijdingsmiddelen en de grondstoffen voor de landbouw, tuinbouw, bosbouw en veeteelt;

Gelet op de wet van 24 januari 1977 betreffende de bescherming van de gezondheid van de verbruikers op het stuk van de voedingsmiddelen en andere produkten, gewijzigd bij de wet van 22 maart 1989;

Gelet op de wet van 14 juli 1991 betreffende de handelspraktijken en de voorlichting en bescherming van de consument, gewijzigd bij de wet van 5 november 1993;

MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTE PUBLIQUE
ET DE L'ENVIRONNEMENT, MINISTERE DES AFFAIRES ECO-
NOMIQUES, MINISTERE DE L'INTERIEUR, MINISTERE DE
L'EMPLOI ET DU TRAVAIL ET MINISTERE DES CLASSES
MOYENNES ET DE L'AGRICULTURE

F. 98 — 770

[S - C - 97/22891]

13 NOVEMBRE 1997. — Arrêté royal modifiant l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement

ALBERT II, Roi des Belges,
A tous, présents et à venir, Salut.

Vu la loi du 24 février 1921 concernant le trafic des substances vénéneuses, soporifiques, stupéfiantes, désinfectantes et antiseptiques, notamment l'article 1^{er}, modifié par les lois des 11 mars 1958, 1^{er} juillet 1976 et 14 juillet 1994;

Vu la loi du 4 août 1996 relative au bien être des travailleurs lors de l'exécution de leur travail;

Vu la loi du 28 mai 1956 relative aux substances et mélanges explosibles ou susceptibles de déflager et aux engins qui en sont chargés;

Vu la loi du 11 juillet 1969 relative aux pesticides et aux matières premières pour l'agriculture, l'horticulture, la sylviculture et l'élevage;

Vu la loi du 24 janvier 1977 relative à la protection de la santé des consommateurs en ce qui concerne les denrées alimentaires et les autres produits, modifiée par la loi du 22 mars 1989;

Vu la loi du 14 juillet 1991 sur les pratiques du commerce, et sur l'information et la protection du consommateur, modifiée par la loi du 5 novembre 1993;

Gelet op de richtlijn 67/548/EEG van de Raad van de Europese Gemeenschappen van 27 juni 1967 betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen van de Lid-Staten inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen, laatstelijk gewijzigd bij richtlijn 96/56/EG van het Europees Parlement en de Raad van 3 september 1996;

Gelet op het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989 en van 19 juli 1994 alsook op het koninklijk besluit van 14 september 1993 tot aanstelling van de diensten en ambtenaren belast met het opsporen en vaststellen van de inbreuken op de bepalingen van voormeld koninklijk besluit van 24 mei 1982;

Gelet op het koninklijk besluit van 27 oktober 1988 betreffende de toepassing van de beginselen van goede laboratoriumpraktijken en het toezicht op de uitvoering ervan bij proeven op scheikundige stoffen alsook op het koninklijk besluit van 14 november 1993 betreffende de bescherming van proefdieren;

Gelet op het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 21 december 1994;

Gelet op het advies van de Hoge Raad voor de Middenstand van 31 maart 1995;

Gelet op het advies van de Hoge Raad voor veiligheid, gezondheid en verfraaiing van de werkplaatsen van 21 april 1995;

Gelet op de wetten op de Raad van State, gecoördineerd op 12 januari 1973, inzonderheid op artikel 3, § 1, gewijzigd door de wetten van 9 augustus 1980, 16 juni 1989 en 4 juli 1989;

Gelet op de dringende noodzakelijkheid :

Overwegende dat de volgende richtlijnen, waarvan de omzettingstermijn verstreken is, onverwijld moeten worden omgezet :

1° de richtlijn 90/517/EEG van de Raad van 9 oktober 1990 houdende elfde aanpassing aan de technische vooruitgang van richtlijn 67/548/EEG van de Raad betreffende de aanpassing van de wettelijke en bestuursrechtelijke bepalingen inzake de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke stoffen;

2° de richtlijn 91/325/EEG van de Commissie van 1 maart 1991 houdende twaalfde aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

3° de richtlijn 91/326/EEG van de Commissie van 5 maart 1991 houdende dertiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

4° de richtlijn 91/410/EEG van de Commissie van 22 juli 1991 houdende veertiende aanpassing aan de technische vooruitgang van richtlijn 67/548/EEG;

5° de richtlijn 91/632/EEG van de Commissie van 28 oktober 1991 houdende vijftiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

6° de richtlijn 92/32/EEG van de Raad van 30 april 1992 tot zevende wijziging van richtlijn 67/548/EEG;

7° de richtlijn 92/37/EEG van de Commissie van 30 april 1992 houdende zestiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

8° de richtlijn 92/69/EEG van de Commissie van 31 juli 1992 houdende zeventiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

Vu la directive 67/548/CEE du Conseil des Communautés européennes 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, modifiée, en dernier lieu, par la directive 96/56/CE du Parlement européen et du Conseil du 3 septembre 1996;

Vu l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989 et du 19 juillet 1994 ainsi que l'arrêté royal du 14 septembre 1993 portant désignation des services et fonctionnaires chargés de rechercher et de constater les infractions aux dispositions de l'arrêté royal du 24 mai 1982 précité;

Vu l'arrêté royal du 27 octobre 1988 relatif à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et au contrôle de leur application pour les essais sur les substances chimiques ainsi que l'arrêté royal du 14 novembre 1993 relatif à la protection des animaux d'expérience;

Vu l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995;

Vu l'avis du Conseil de la Consommation du 21 décembre 1994;

Vu l'avis du Conseil supérieur des Classes moyennes du 31 mars 1995;

Vu l'avis du Conseil supérieur de sécurité, d'hygiène et d'embellissement des lieux de travail du 21 avril 1995;

Vu les lois sur le Conseil d'Etat, coordonnées le 12 janvier 1973, notamment l'article 3, § 1^{er}, modifié par les lois des 9 août 1980, 16 juin 1989 et 4 juillet 1989;

Vu l'urgence :

Considérant qu'il convient de transposer, sans retard, les directives suivantes dont le délai de transposition est écoulé :

1° la directive 90/517/CEE du Conseil du 9 octobre 1990 portant onzième 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;

2° la directive 91/325/CEE de la Commission du 1^{er} mars 1991 portant douzième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

3° la directive 91/326/CEE de la Commission du 5 mars 1991 portant treizième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

4° la directive 91/410/CEE de la Commission du 22 juillet 1991 portant quatorzième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

5° la directive 91/632/CEE de la Commission du 28 octobre 1991 portant quinzième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

6° la directive 92/32/CEE du Conseil du 30 avril 1992 portant septième modification de la directive 67/548/CEE;

7° la directive 92/37/CEE de la Commission du 30 avril 1992 portant seizième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

8° la directive 92/69/CEE de la Commission du 31 juillet 1992 portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

9° de richtlijn 93/21/EEG van de Commissie van 27 april 1993 tot achtttiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

10° de richtlijn 93/67/EEG van de Commissie van 20 juli 1993 tot vaststelling van de beginselen die gelden bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu van stoffen die zijn aangegeven krachtens richtlijn 67/548/EEG;

11° de richtlijn 93/90/EEG van de Commissie van 29 oktober 1993 betreffende de lijst van stoffen, bedoeld in artikel 13, lid 1, vijfde streepje, van richtlijn 67/548/EEG;

12° de richtlijn 93/105/EEG van de Commissie van 25 november 1993 houdende vaststelling van bijlage VII D inzake de informatie die in het in artikel 12 van de richtlijn tot zevende wijziging van de richtlijn 67/548/EEG bedoelde technisch dossier moet worden opgenomen;

13° de richtlijn 93/112/EEG van de Commissie van 10 december 1993 tot wijziging van richtlijn 91/155/EEG houdende beschrijving en vaststelling van de wijze van uitvoering voor het systeem voor specifieke informatie inzake gevaarlijke preparaten krachtens artikel 10 van richtlijn 88/379/EEG;

14° de richtlijn 93/72/EEG van de Commissie van 1 september 1993 tot negentiende aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

15° de richtlijn 93/101/EEG van de Commissie van 11 november 1993 tot twintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek van richtlijn 67/548/EEG;

Overwegende dat het Hof van Justitie van de Europese Gemeenschappen op 12 december 1996 het Koninkrijk België heeft veroordeeld wegens niet-omzetting van de richtlijnen 93/105/EEG van 25 november 1993, 92/69/EEG van 31 juli 1992, 93/67/EEG van 20 juli 1993 en 92/32/EEG van 30 april 1992, respectievelijk in de zaken C-218/96, C-220/96, C-221/96 en C-222/96;

Op de voordracht van Onze Vice-Eerste Minister en Minister van Economie, van Onze Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken, van Onze Minister van Volksgezondheid, van Onze Minister van Tewerkstelling en Arbeid, van Onze Minister van Landbouw en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen en van Onze Staatssecretaris voor Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

Artikel 1. De artikelen 1 tot en met 9 van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, van 14 september 1989 en van 19 juli 1994 worden vervangen door de volgende bepalingen :

« Artikel 1. § 1. Dit besluit is van toepassing op de kennisgeving van stoffen, de uitwisseling van informatie over stoffen waarvan kennisgeving is gedaan, de beoordeling van het potentiële risico voor mens en milieu van stoffen waarvan kennisgeving is gedaan alsook de indeling, de verpakking en het kenmerken van voor mens of milieu gevaarlijke stoffen wanneer deze op de markt worden gebracht.

§ 2. Dit besluit is niet van toepassing op :

1° de volgende stoffen en preparaten in het eindstadium, die bestemd zijn voor de eindgebruiker :

- a) geneesmiddelen voor menselijk of diergeneeskundig gebruik;
- b) cosmetische produkten;
- c) mengsels van stoffen, in de vorm van afvalstoffen;
- d) levensmiddelen;
- e) diervoeder;

9° la directive 93/21/CEE de la Commission du 27 avril 1993 portant dix-huitième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

10° la directive 93/67/CEE de la Commission du 20 juillet 1993 établissant les principes d'évaluation des risques pour l'homme et pour l'environnement des substances notifiées conformément à la directive 67/548/CEE;

11° la directive 93/90/CEE de la Commission du 29 octobre 1993 concernant la liste des substances visées à l'article 13, paragraphe 1^{er}, cinquième tiret de la directive 67/548/CEE;

12° la directive 93/105/CEE de la Commission du 25 novembre 1993 établissant l'annexe VII D contenant les informations requises pour les dossiers techniques visés à l'article 12 de la directive portant septième modification de la directive 67/548/CEE;

13° la directive 93/112/CEE de la Commission du 10 décembre 1993 modifiant la directive 91/155/CEE de la Commission définissant et fixant, en application de l'article 10 de la directive 88/379/CEE du Conseil, les modalités du système d'information spécifique relatif aux préparations dangereuses;

14° la directive 93/72/CEE de la Commission du 1^{er} septembre 1993 portant dix-neuvième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

15° la directive 93/101/CEE de la Commission du 11 novembre 1993 portant vingtième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE;

Considérant que la Cour de Justice des Communautés européennes a condamné la Belgique, le 12 décembre 1996, en raison de non transposition des directives 93/105/CEE du 25 novembre 1993, 92/69/CEE du 31 juillet 1992, 93/67/CEE du 20 juillet 1993 et 92/32/CEE du 30 avril 1992, respectivement dans les affaires C-218/96, C-220/96, C-221/96 et C-222/96;

Sur la proposition de Notre Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie, de Notre Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur, de Notre Ministre de la Santé publique, de Notre Ministre de l'Emploi et du Travail, de Notre Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises et de Notre Secrétaire d'Etat à l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

Article 1^{er}. Les articles 1 à 9 de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989 et 19 juillet 1994 sont remplacés par les dispositions suivantes :

« Article 1^{er}, § 1^{er}. Le présent arrêté vise la notification de substances, l'échange d'informations, relatives aux substances notifiées, l'évaluation des risques potentiels pour l'homme et pour l'environnement des substances notifiées, la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses pour l'homme ou pour l'environnement, lorsque celles-ci sont mises sur le marché.

§ 2. Les dispositions du présent arrêté ne s'appliquent pas :

1° aux substances et préparations suivantes, au stade fini, destinées à l'utilisateur final :

- a) aux médicaments à usage humain ou vétérinaire;
- b) aux produits cosmétiques;
- c) aux mélanges de substances sous la forme de déchets;
- d) aux denrées alimentaires;
- e) aux aliments pour animaux;

f) bestrijdingsmiddelen;

g) radioactieve stoffen;

h) andere stoffen of preparaten waarvoor communautaire kennisgevings- of goedkeuringsprocedures bestaan en waarvoor bepalingen gelden welke gelijkwaardig zijn aan die van dit besluit. Te dien einde stelt de Minister een lijst op van categorieën van produkten, die hij regelmatig kan aanpassen;

2° het vervoer van gevaarlijke stoffen per spoor, over de weg, per schip of door de lucht;

3° stoffen in transit onder douanetoezicht, voor zover die stoffen niet worden bewerkt of verwerkt.

§ 3. Voor de toepassing van dit besluit wordt verstaan onder :

a) « stoffen » : chemische elementen en hun verbindingen, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het produkt en alle onzuiverheden ten gevolge van het produktieproces, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd;

b) « preparaten » : mengsels of oplossingen die bestaan uit twee of meer stoffen;

c) « polymeer » : een stof die bestaat uit moleculen welke worden gekenmerkt door een opeenvolging van een of meer soorten monomeereenheden, en die een gewichtsmeerderheid van moleculen bevat die bestaan uit ten minste drie monomeereenheden die op covalente wijze aan ten minste een andere monomeereenheid of andere reactieve stof zijn gebonden en bestaat uit minder dan een gewichtsmeerderheid aan moleculen van hetzelfde molecuulgewicht. Die moleculen moeten over een reeks molecuulgewichten verdeeld zijn, waarbij de verschillen in molecuulgewicht op de eerste plaats het gevolg zijn van verschillen in aantal monomeereenheden. « Monomeereenheid » in de zin van deze definitie betekent de gereageerde vorm van een monomeer in een polymeer;

d) « kennisgeving » : documenten waarin de vereiste inlichtingen bij de Minister worden opgegeven :

1° voor in België vervaardigde stoffen : door de fabrikant die een stof, als zodanig of in een preparaat verwerkt, op de markt brengt;

2° voor buiten de Europese Unie vervaardigde stoffen : door een in België gevestigde persoon die ervoor verantwoordelijk is dat een stof als zodanig of in een preparaat verwerkt in de Europese Unie op de markt wordt gebracht, of door de in België gevestigde persoon die door de fabrikant als enige vertegenwoordiger is aangewezen om van een bepaalde stof die, als zodanig of in een preparaat verwerkt, op de communautaire markt wordt gebracht kennisgeving te doen.

Degene die een kennisgeving doet, wordt hierna « kennisgever » genoemd;

e) « op de markt brengen » : het ter beschikking stellen aan derden. Invoer in het douanegebied van de Europese Unie wordt in de zin van dit besluit beschouwd als op de markt brengen;

f) « wetenschappelijk onderzoek en wetenschappelijke ontwikkeling » : wetenschappelijke proefneming of analyse in gecontroleerde omstandigheden. Dit omvat de bepaling van intrinsieke eigenschappen, prestatie en werkzaamheid, alsmede wetenschappelijk onderzoek in verband met de produktontwikkeling;

g) « produktiegericht onderzoek en produktiegerichte ontwikkeling » : verdere ontwikkeling van een stof waarbij de toepassingsgebieden van de stof worden getest met behulp van proefproducties of produktie-experimenten;

f) aux pesticides;

g) aux substances radioactives;

h) aux autres substances ou préparations pour lesquelles il existe des procédures communautaires de notification ou d'agrément et qui sont soumises à des exigences équivalentes à celles prévues au présent arrêté. Le Ministre établira, à cette fin, une liste de catégories de produits qu'il pourra mettre à jour périodiquement;

2° au transport des substances dangereuses, par voie ferrée, routière, fluviale, maritime ou aérienne;

3° aux substances, en transit, soumises à un contrôle douanier, pour autant qu'elles ne fassent pas l'objet d'un traitement ou d'une transformation.

§ 3. Pour l'application du présent arrêté, on entend par :

a) « substances » : les éléments chimiques et leurs composés à l'état naturel ou tels qu'obtenus par tout procédé de production, contenant tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté dérivant du procédé de production, à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition;

b) « préparations » : les mélanges ou solutions composés de deux substances ou plus;

c) « polymère » : une substance constituée de molécules se caractérisant par une séquence d'un ou de plusieurs types d'unités monomères et contenant une simple majorité pondérale de molécules contenant, au moins, trois unités monomères liées par liaison covalente à au moins une autre unité monomère ou une autre substance réactive et constituée de moins qu'une simple majorité pondérale de molécules de même poids moléculaire. Ces molécules doivent former une gamme de poids moléculaires au sein de laquelle les différences de poids moléculaire sont, essentiellement, attribuables à la différence dans le nombre d'unités monomères. Au sens de la présente définition, on entend par « unité monomère » la forme réagie d'un monomère dans un polymère;

d) « notification » : les actes, assortis des informations requises, introduits auprès du Ministre :

1° pour les substances fabriquées en Belgique : par le fabricant qui met une substance sur le marché, en tant que telle ou incorporée dans une préparation;

2° pour les substances fabriquées en dehors de l'Union européenne : par une personne établie en Belgique et responsable de la mise sur le marché de l'Union européenne de la substance en tant que telle ou incorporée dans une préparation ou par la personne qui, établie en Belgique, est désignée, par le fabricant, comme son représentant exclusif pour les besoins de la soumission de la notification relative à une substance donnée mise sur le marché communautaire européen en tant que telle ou incorporée à une préparation.

La personne qui introduit une notification, telle que définie ci-dessus, est dénommée « notifiant »;

e) « mise sur le marché » : la mise à disposition de tiers. L'importation sur le territoire douanier de l'Union européenne est considérée, au sens du présent arrêté, comme une mise sur le marché;

f) « recherche et développement scientifique » : l'expérimentation scientifique, l'analyse ou la recherche chimique sous conditions contrôlées. Cette définition comprend la détermination des propriétés intrinsèques, des performances et de l'efficacité, de même que les recherches scientifiques relatives au développement du produit;

g) « recherche et développement de production » : le développement ultérieur d'une substance, au cours duquel les domaines d'application de la substance sont testés par le biais de productions pilotes ou d'essais de production;

h) « EINECS » : (European Inventory of Existing Commercial Substances) : de Europese inventaris van bestaande commerciële stoffen. Deze inventaris bevat de definitieve lijst van alle stoffen die geacht worden op 18 september 1981 op de markt van de Europese Unie voor te komen;

i) « ELINCS » : (European List of Notified Chemical Substances) : de Europese lijst van chemische stoffen waarvan kennis is gegeven vanaf 18 september 1981 volgens de geharmoniseerde communautaire kennisgevingsprocedure.

De beperkte kennisgevingen gedaan volgens artikel 9, §1, d, van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 vallen niet onder deze alinea. Deze stoffen werden bijgevolg niet opgenomen in deze Europese lijst;

j) « omschrijving van de gevaren » : het vaststellen van de aard van de schadelijke effecten op grond van de intrinsieke eigenschappen van de stof;

k) « evaluatie van de dosis-respons (concentratie-effect) relatie » : de schatting van de relatie tussen de dosis van, of mate van blootstelling aan, een stof en de incidentie en ernst van het effect;

l) « evaluatie van de blootstelling » : de bepaling van de emissies van een stof, de manieren waarop en de snelheid waarmee zij wordt gemobiliseerd alsmede de relevante omzettings- of afbraakprocessen, met het oog op de bepaling van de concentraties/dosissen waaraan menselijke populaties of milieucompartimenten zijn of kunnen worden blootgesteld;

m) « karakterisering van het risico » : de inschatting van de incidentie en ernst van de schadelijke effecten waarvan kan worden verwacht dat ze in menselijke populaties of milieucompartimenten zullen optreden als gevolg van een feitelijke of geschatte blootstelling aan een stof, eventueel met inbegrip van de « schatting van het risico », dat wil zeggen de kwantificering van de bedoelde kans;

n) « aanbevelingen ter beperking van het risico » : het aanbevelen van maatregelen die de risico's voor mens en/of milieu van het in de handel brengen van de betrokken stof kunnen beperken, zoals :

1) wijziging van de indeling, de verpakking of de etikettering van de stof als voorgesteld door de kennisgever in de overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, artikel 2, § 2, 1° of 2°, ingediende kennisgeving;

2) wijziging van het veiligheidsinformatieblad als voorgesteld door de kennisgever in de overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, artikel 2, § 2, 1° of 2°, ingediende kennisgeving;

3) wijziging van de in de punten 2.3, 2.4 en 2.5, van de bijlagen VII A, VII B of VII C, bedoelde aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen of noodmaatregelen als voorgesteld door de kennisgever in het technisch dossier van de overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, artikel 2, § 2, 1° of 2°, ingediende kennisgeving;

4) advies aan de betrokken controlerende instanties inzake het nemen van passende maatregelen ter bescherming van mens en/of milieu in het licht van de vastgestelde risico's;

o) « De Minister » : De Minister of Staatssecretaris die de Volksgezondheid en het Leefmilieu onder zijn bevoegdheid heeft, hierna de « Minister » genoemd.

§ 4. « Gevaarlijk » in de zin van dit besluit zijn de volgende stoffen en preparaten :

a) « ontplofbare » : stoffen en preparaten in vaste, vloeibare, pasta- of gelatineachtige toestand, die ook zonder de inwerking van zuurstof in de lucht exotherm kunnen reageren, hierbij snel gassen ontwikkelen en onder bepaalde (proef) voorwaarden detoneren, snel explosief verbranden of door verhitting bij gedeeltelijke afsluiting ontploffen;

b) « oxyderende » : stoffen en preparaten die bij aanraking met andere stoffen, met name ontvlambare stoffen, sterk exotherm reageren;

h) « EINECS » (European Inventory of Existing Commercial Substances) : l'inventaire européen de substances commerciales existantes. Cet inventaire contient la liste définitive de toutes les substances sensées se trouver sur le marché de l'Union européenne au 18 septembre 1981;

i) « ELINCS » (European List of Notified Chemical Substances) : liste européenne des substances chimiques ayant été notifiées à partir du 18 septembre 1981 selon la procédure de notification communautaire harmonisée.

Les notifications réduites, effectuées aux termes de l'article 9, §1^{er}, d, de l'arrêté royal du 24 mai 1982, ne tombent pas sous le couvert du présent alinéa. Ces substances ne sont, dès lors, pas reprises dans cette liste européenne;

j) « identification des dangers », l'identification des effets indésirables qu'une substance est intrinsèquement capable de provoquer;

k) « évaluation du rapport dose-réponse (concentration-effet) » : l'estimation de la relation entre la dose, ou le niveau d'exposition à une substance, et l'incidence et la gravité d'un effet;

l) « évaluation de l'exposition », la détermination des émissions, des voies de transfert et des vitesses de déplacement d'une substance et de sa transformation ou de sa dégradation afin d'évaluer les concentrations/doses auxquelles les populations humaines ou les composantes de l'environnement sont exposées ou susceptibles de l'être;

m) « caractérisation des risques », l'estimation de l'incidence et de la gravité des effets indésirables susceptibles de se produire dans une population humaine ou une composante de l'environnement en raison de l'exposition, réelle ou prévisible, à une substance; la caractérisation peut comprendre l'« estimation du risque », c'est-à-dire la quantification de cette probabilité;

n) « recommandations concernant la réduction des risques », la recommandation de mesures qui permettraient de réduire les risques que présente, pour l'homme et/ou l'environnement, la commercialisation de la substance; il peut s'agir :

1) de modifications de la classification, de l'emballage ou de l'étiquetage de la substance proposée par le notifiant dans la notification transmise conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1° ou 2°;

2) de modifications de la fiche de données de sécurité proposée par le notifiant dans la notification transmise conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1° ou 2°;

3) de modifications des méthodes et des précautions recommandées ou des mesures d'urgence dont la spécification est prévue aux sections 2.3, 2.4 et 2.5, des annexes VII A, VII B ou VII C, et qui sont proposées, par le notifiant, dans le dossier technique accompagnant la notification introduite conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1° ou 2°;

4) de conseils à l'intention des autorités de contrôle concernées leur recommandant d'envisager des mesures adéquates de protection de l'homme et/ou de l'environnement contre les risques identifiés;

o) « Le Ministre » : Le Ministre ou le Secrétaire d'Etat qui a la Santé publique et l'Environnement dans ses attributions, dénommé ci-après le « Ministre ».

§ 4. Sont « dangereuses », au sens du présent arrêté, les substances et préparations :

a) « explosibles » : substances et préparations solides, liquides, pâteuses ou gélatineuses qui, même sans intervention d'oxygène atmosphérique, peuvent présenter une réaction exothermique avec développement rapide de gaz et qui, dans des conditions d'essais déterminées, detonent, déflagrent rapidement ou, sous l'effet de la chaleur, explosent en cas de confinement partiel;

b) « comburantes » : substances et préparations qui, au contact d'autres substances, notamment de substances inflammables, présentent une réaction fortement exothermique;

c) « zeer licht ontvlambare » : stoffen en preparaten in vloeibare toestand met een uiterst laag vlampunt en een laag kookpunt, alsmede gasvormige stoffen en preparaten die bij normale temperatuur en druk aan de lucht blootgesteld kunnen ontbranden;

d) « licht ontvlambare » : stoffen en preparaten die bij normale temperatuur aan de lucht blootgesteld, zonder toevoer van energie, in temperatuur kunnen stijgen en tenslotte kunnen ontbranden, of vaste stoffen en preparaten die na kortstondige inwerking van een ontstekingsbron gemakkelijk kunnen ontbranden en na verwijdering van de ontstekingsbron blijven branden of gloeien, of vloeibare stoffen en preparaten met een zeer laag vlampunt, of stoffen en preparaten die bij aanraking met water of vochtige lucht een gevaarlijke hoeveelheid van zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;

e) « ontvlambare » : vloeibare stoffen en preparaten met een laag vlampunt;

f) « zeer vergiftige » : stoffen en preparaten waarvan reeds een zeer geringe hoeveelheid bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische aandoeningen en zelfs de dood kan veroorzaken;

g) « vergiftige » : stoffen en preparaten waarvan reeds een geringe hoeveelheid bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische aandoeningen en zelfs de dood kan veroorzaken;

h) « schadelijke » : stoffen en preparaten die bij inademing of opneming via de mond of via de huid acute of chronische aandoeningen en zelfs de dood kunnen veroorzaken;

i) « bijtende » : stoffen en preparaten die bij aanraking met levende weefsels daarop een vernietigende werking kunnen uitoefenen;

j) « irriterende » : niet-bijtende stoffen en preparaten die bij directe, langdurige of herhaalde aanraking met de huid of de slijmvliezen een ontsteking kunnen veroorzaken;

k) « sensibiliserende » : stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de huid aanleiding kunnen geven tot een zodanige reactie van hypersensibilisatie dat latere blootstelling aan de stof of het preparaat karakteristieke nadelige effecten veroorzaakt;

l) « kankerverwekkende » : stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid kanker kunnen veroorzaken of de frequentie daarvan doen toenemen;

m) « mutagene » : stoffen en preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid erfelijke genetische afwijkingen kunnen veroorzaken of de frequentie daarvan doen toenemen;

n) « voor de voortplanting vergiftige » : stoffen of preparaten die bij inademing of bij opneming via de mond of via de huid niet-erfelijke afwijkingen bij het nageslacht en/of aantasting van de mannelijke of vrouwelijke voortplantingsfuncties of -vermogens veroorzaken, dan wel de frequentie daarvan doen toenemen;

o) « milieugevaarlijke » : stoffen en preparaten die, wanneer zij in het milieu terechtkomen, onmiddellijk of na verloop van tijd gevaar voor één of meer milieucompartimenten opleveren of kunnen opleveren.

§ 5. De bevoegde instantie in de zin van dit besluit is de Minister of Staatssecretaris die de Volksgezondheid en het Leefmilieu onder zijn bevoegdheid heeft. Kennisgevingsdossiers moeten aan hem worden gericht op het adres : Commissie Gevaarlijke Producten, Rijksadministratief Centrum, 1010 Brussel. De Minister kan dit adres te allen tijde wijzigen.

Art. 2. § 1. Volledige kennisgeving :

1° Onverminderd artikel 1, § 2, artikel 2, § 2, 1°, artikel 2, § 7, en artikel 5, § 2, punt I, 4, en punt II, is elke kennisgever van een stof verplicht aan de Minister, zoals bedoeld in artikel 1, § 3, o, bij een ter post aangetekend schrijven, een kennisgeving te doen toekomen omvattende :

A. Een dossier in vier exemplaren bestaande uit :

a) een technisch dossier met alle beschikbare relevante inlichtingen op grond waarvan de te voorziene onmiddellijke of latere gevaren die de stof voor mens en milieu kan opleveren, kunnen worden beoordeeld.

c) « extrêmement inflammables » : substances et préparations liquides dont le point d'éclair est extrêmement bas et dont le point d'ébullition est bas, ainsi que les substances et préparations gazeuses qui, à température et pression ambiantes, sont inflammables à l'air;

d) « facilement inflammables » : substances et préparations pouvant s'échauffer au point de s'enflammer à l'air, à température ambiante, sans apport d'énergie ou à l'état solide, qui peuvent s'enflammer facilement par une brève action d'une source d'inflammation et qui continuent à brûler ou à se consumer après le retrait de la source d'inflammation ou à l'état liquide, dont le point d'éclair est très bas ou qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, produisent des gaz extrêmement inflammables en quantités dangereuses;

e) « inflammables » : substances et préparations liquides, dont le point d'éclair est bas;

f) « très toxiques » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, en très petites quantités, peuvent entraîner la mort ou des risques aigus ou chroniques;

g) « toxiques » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée en petites quantités, peuvent entraîner la mort ou des risques aigus ou chroniques;

h) « nocives » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent entraîner la mort ou des risques aigus ou chroniques;

i) « corrosives » : substances et préparations qui, en contact avec des tissus vivants, peuvent exercer une action destructrice sur ces derniers;

j) « irritantes » : substances et préparations non corrosives qui, par contact immédiat, prolongé ou répété avec la peau ou les muqueuses, peuvent provoquer une réaction inflammatoire;

k) « sensibilisantes » : substances et préparations qui, par inhalation ou pénétration cutanée, peuvent donner lieu à une réaction d'hypersensibilisation suite à laquelle, lors d'une exposition ultérieure à la substance ou à la préparation, des effets néfastes caractéristiques se déclarent;

l) « cancérogènes » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée peuvent produire le cancer ou en augmenter la fréquence;

m) « mutagènes » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire des défauts génétiques héréditaires ou en augmenter la fréquence;

n) « toxiques pour la reproduction » : substances et préparations qui, par inhalation, ingestion ou pénétration cutanée, peuvent produire ou augmenter la fréquence d'effets nocifs, non héréditaires, dans la progéniture ou porter atteinte aux fonctions ou capacités reproductives mâles ou femelles;

o) « dangereuses pour l'environnement » : substances et préparations qui, si elles entraient dans l'environnement, présenteraient ou pourraient présenter un risque immédiat ou différé pour une ou plusieurs composantes de l'environnement.

§ 5. L'autorité compétente au sens du présent arrêté est le Ministre ou le Secrétaire d'Etat qui a la Santé publique et l'Environnement dans ses compétences. Les dossiers de notification doivent lui être adressés à l'adresse : Commission des Produits dangereux, Cité administrative de l'Etat, 1010 Bruxelles. Le Ministre peut modifier cette adresse en tout temps.

Art. 2. § 1^{er}. Notification complète :

1° Sans préjudice de l'article 1^{er}, § 2, l'article 2, § 2, 1°, l'article 2, § 7, et l'article 5, § 2, point I, 4, et point II, tout notifiant d'une substance est tenu d'introduire, par pli recommandé auprès du Ministre visé à l'article 1^{er}, § 3, o, une notification comportant :

A. Un dossier en quatre exemplaires constitué de :

a) un dossier technique fournissant les éléments permettant d'apprécier les risques prévisibles, immédiats ou différés que la substance peut présenter pour l'homme ou l'environnement et contenant toutes les données disponibles utiles pour cette appréciation.

Dit dossier bevat ten minste de gegevens en resultaten van de onderzoeken bedoeld in bijlage VII A, alsook een gedetailleerde en volledige beschrijving van de verrichte onderzoeken en de toegepaste methoden of een bibliografische opgave daarvan;

b) een verklaring betreffende de nadelige gevolgen van de stof naar gelang van de verschillende voorzienbare toepassingen;

c) het voorstel voor de indeling en het kenmerken van de stof overeenkomstig dit besluit;

d) uitsluitend in het geval van gevaarlijke stoffen, een voorstel voor een veiligheidsinformatieblad, als bepaald in artikel 9, § 2;

e) indien gewenst, een met redenen omkleed verzoek van de kennisgever om de kennisgeving uit te zonderen van de toepassing van artikel 4, § 2, gedurende een periode die in ieder geval uiterlijk één jaar na de datum van kennisgeving verstrijkt.

Indien de fabrikant buiten de Europese Unie is gevestigd, in voorkomend geval een door de kennisgever overeenkomstig artikel 1, § 3, d), 2°, bijgevoegde verklaring van de fabrikant waaruit blijkt dat de kennisgever voor de indiening van de kennisgeving van de bewuste stof door de fabrikant als diens enige vertegenwoordiger is aangewezen.

Indien gewenst, kan de kennisgever de Minister ook een door hemzelf volgens de in artikel 3, § 2, bedoelde beginselen, opgemaakte eerste risicobeoordeling verschaffen.

B. Een samenvatting van het technisch dossier zoals vermeld onder A, a), bevattende bijlage VII en VIII. Deze samenvatting wordt schriftelijk in vier exemplaren en tevens op twee disketten neergelegd. De Minister bepaalt hiervoor de modaliteiten.

2° Onverminderd artikel 2, § 9, informeert de kennisgever van een stof waarvan reeds kennisgeving is gedaan de Minister :

— zodra de op de markt gebrachte hoeveelheid van de stof 10 ton per jaar per fabrikant of de totale op de markt gebrachte hoeveelheid 50 ton per fabrikant bereikt. In die gevallen kan de Minister eisen dat bepaalde of alle op niveau 1 van bijlage VIII vermelde aanvullende proeven/onderzoeken binnen een door hem te bepalen termijn worden uitgevoerd;

— zodra de op de markt gebrachte hoeveelheid van de stof 100 ton per jaar per fabrikant of de totale op de markt gebrachte hoeveelheid 500 ton per fabrikant bereikt. In die gevallen eist de Minister dat de op niveau 1 van bijlage VIII vermelde aanvullende proeven/onderzoeken binnen een door hem te bepalen termijn worden uitgevoerd, behalve wanneer de kennisgever kan aantonen dat een bepaald(e) proef/onderzoek niet geschikt is of dat een ander wetenschappelijk(e) proef of onderzoek de voorkeur geniet;

— zodra de op de markt gebrachte hoeveelheid van de stof 1000 ton per jaar per fabrikant of de totale op de markt gebrachte hoeveelheid 5000 ton per fabrikant bereikt. In dit geval stelt de Minister overeenkomstig niveau 2 van bijlage VIII een programma op van proeven/onderzoeken die binnen een door hem te bepalen termijn door de kennisgever moeten worden uitgevoerd.

3° Wanneer overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, dan wel vrijwillig aanvullende proeven/onderzoeken worden verricht, dient de kennisgever de Minister van de resultaten ervan op de hoogte te stellen en een aanvulling op de samenvatting bij te voegen zoals bepaald in artikel 2, § 1, 1°, B.

§ 2. Beperkte kennisgevingsvoorschriften voor stoffen die in kleinere hoeveelheden dan 1 ton per jaar per fabrikant op de markt worden gebracht :

1° Onverminderd artikel 1, § 2, artikel 2, § 7, 1°, en artikel 5, § 2, punt I, 4, en punt II, is elke kennisgever van een stof die in kleinere hoeveelheden dan 1 ton per jaar per fabrikant op de markt zal worden gebracht, verplicht aan de Minister zoals bedoeld in artikel 1, § 3, o, een kennisgeving te doen toekomen, omvattende :

a) een technisch dossier met alle beschikbare relevante inlichtingen op grond waarvan de te voorziene, onmiddellijke of latere gevaren, die de stof voor mens en milieu kan opleveren, kunnen worden beoordeeld. Dit dossier bevat tenminste de gegevens en resultaten van de

Au minimum, le dossier contiendra les informations et résultats des études visées à l'annexe VII A, ainsi que la description détaillée et complète des études effectuées et des méthodes employées ou leur référence bibliographique;

b) une déclaration concernant les effets défavorables de la substance en fonction des différentes utilisations prévisibles;

c) la proposition de classification et d'étiquetage de la substance conformément aux dispositions du présent arrêté;

d) uniquement dans le cas de substances dangereuses, une proposition de fiche de données de sécurité, tel que prévu à l'article 9, § 2;

e) s'il le désire, une déclaration du notifiant, requérant, de façon justifiée, pour la notification, l'exemption de l'application de l'article 4, § 2, pour une période maximale n'excédant, en aucun cas, un an à dater de la notification.

Dans le cas d'un fabricant établi en dehors de l'Union européenne, le notifiant inclura, le cas échéant, conformément à l'article 1^{er}, § 3, d), 2°, une déclaration du fabricant attestant que, pour les besoins de la soumission de la notification de la substance en question, il est désigné, par le fabricant, comme étant son représentant exclusif.

Outre les informations visées ci-dessus, le notifiant peut, également, fournir, au Ministre, une première évaluation des risques effectuée par ses soins, selon les principes visés à l'article 3, § 2.

B. Un résumé du dossier technique comme annoncé sous A, a), comprenant les annexes VII et VIII. Ce résumé est déposé, par écrit, en quatre exemplaires et, également, sur deux disquettes. Le Ministre en fixe les modalités.

2° Sans préjudice de l'article 2, § 9, tout notifiant d'une substance déjà notifiée, est tenu d'informer le Ministre :

— si la quantité de substance, mise sur le marché, atteint 10 tonnes par an, par fabricant, ou si la quantité totale, mise sur le marché, atteint 50 tonnes par fabricant. Dans ce cas, le Ministre peut exiger la réalisation, dans un délai déterminé par lui, de certains ou de tous les essais et de toutes les études complémentaires, mentionnées au niveau 1 de l'annexe VIII;

— si la quantité de substance, mise sur le marché, atteint 100 tonnes par an, par fabricant, ou si la quantité totale, mise sur le marché, atteint 500 tonnes par fabricant. Dans ce cas, le Ministre exige la réalisation, dans un délai déterminé par lui, des essais et études complémentaires mentionnées au niveau 1 de l'annexe VIII, sauf si le notifiant peut justifier qu'un essai ou une étude n'est pas approprié ou qu'un essai ou une étude scientifique de remplacement est préférable;

— si la quantité de substance mise sur le marché, atteint 1.000 tonnes par an, par fabricant, ou quand la quantité totale, mise sur le marché, atteint 5.000 tonnes par fabricant. Dans ce cas, le Ministre établira un programme d'essais ou d'études à réaliser, par le notifiant, dans un délai déterminé par Lui, conformément au niveau 2 de l'annexe VIII.

3° Lorsque des essais complémentaires sont effectués soit conformément aux exigences de l'article 2, § 1^{er}, 2°, soit volontairement, le notifiant communique les résultats des études réalisées, au Ministre, et joint un complément au résumé prévu à l'article 2, § 1^{er}, 1°, B.

§ 2. Exigences réduites pour la notification de substances mises sur le marché en quantités inférieures à une tonne par an par fabricant :

1° Sans préjudice de l'article 1^{er}, § 2, de l'article 2, § 7, 1°, et de l'article 5, § 2, point I, 4, et point II, tout notifiant qui entend mettre une substance sur le marché, en quantités inférieures à une tonne par an et par fabricant, est tenu de soumettre, au Ministre visé à l'article 1^{er}, § 3, o, une notification qui comprend :

a) Un dossier technique fournissant les éléments permettant d'apprécier les risques prévisibles, immédiats ou différés que la substance peut présenter pour l'homme et l'environnement et contenant toutes les données disponibles utiles pour cette appréciation. Au minimum, le

onderzoeken bedoeld in bijlage VII B alsook een gedetailleerde en volledige beschrijving van de verrichte onderzoeken en de toegepaste methoden of een bibliografische opgave daarvan;

b) alle andere informatie als bedoeld in artikel 2, § 1, 1°, met uitzondering van deze vermeld in artikel 2 §1,1°,A,a.

2° Wanneer de stof in kleinere hoeveelheden dan 100 kilogram per jaar per fabrikant op de markt wordt gebracht, mag de kennisgever, onverminderd artikel 2, § 1, 1°, de informatie in het bovengenoemde technische dossier van de kennisgeving beperken tot de in bijlage VII C gespecificeerde gegevens.

3° Wanneer een kennisgever overeenkomstig artikel 2, § 2, 2°, een beperkt kennisgevingsdossier heeft ingediend, verstrekt hij, voordat de op de markt gebrachte hoeveelheid van de stof 100 kilogram per jaar per fabrikant bereikt of voordat de totale op de markt gebrachte hoeveelheid 500 kilogram per fabrikant bereikt, de Minister de aanvullende informatie die nodig is om het technisch dossier op het niveau van bijlage VII B te brengen en een aanpassing van het samenvattingsdossier zoals bedoeld onder artikel 2, § 1, 1°, B, laten geworden.

4° Evenzo moet de kennisgever, ingeval hij overeenkomstig artikel 2, § 2, 1°, een beperkt kennisgevingsdossier heeft ingediend, voordat de hoeveelheid op de markt gebrachte stof 1 ton per jaar per fabrikant bereikt of voordat de totale op de markt gebrachte hoeveelheid 5 ton per fabrikant bereikt, een volledige kennisgeving indienen overeenkomstig artikel 2, § 1.

5° De stoffen waarvan overeenkomstig artikel 2, § 2, 1° en 2°, kennisgeving is gedaan, moeten, voor zover de kennisgever redelijkerwijs kennis moet hebben van hun gevaarlijke eigenschappen, overeenkomstig de artikelen 7 en 8 en de criteria van bijlage VI worden verpakt en voorlopig gekenmerkt. Indien het nog niet mogelijk mocht zijn deze te kenmerken volgens de beginselen van artikel 8, § 1, moet op het etiket, benevens de aanduidingen op grond van reeds uitgevoerde proeven, de waarschuwing « Opgelet ! Nog niet volledig geteste stof » worden aangebracht.

§ 3. Stoffen waarvan reeds kennis is gegeven volgens de geharmoniseerde kennisgevingsprocedure (regel van tien jaar). De kennisgever behoeft de informatie die krachtens artikel 2, §§ 1 en 2, vereist is voor het in bijlage VII A, VII B, VII C of VII D, beschreven technische dossier, met uitzondering van de punten 1 en 2, van deze bijlagen niet te verstrekken, indien deze gegevens ten minste tien jaar voordien reeds zijn ingediend.

§ 4. Op de markt brengen van stoffen waarvan kennisgeving is gedaan :

1° Tenzij de Minister anders aangeeft mogen stoffen waarvan overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, kennisgeving is gedaan ten vroegste zestig dagen nadat de Minister het kennisgevingsdossier conform de eisen van dit besluit heeft ontvangen, op de markt worden gebracht.

Indien de Minister oordeelt dat het dossier niet in overeenstemming is met dit besluit en de kennisgever daarvan overeenkomstig artikel 5, § 4, in kennis stelt, mag de stof pas zestig dagen nadat de Minister de gegevens heeft ontvangen waarmee de kennisgeving in overeenstemming met dit besluit kan worden gebracht, op de markt worden gebracht.

2° Tenzij de Minister anders aangeeft, mag de stof waarvan overeenkomstig artikel 2, § 2, 1° of 2°, kennisgeving is gedaan, ten vroegste dertig dagen nadat de Minister het kennisgevingsdossier conform de eisen van dit besluit heeft ontvangen, op de markt worden gebracht.

Indien de Minister oordeelt dat het dossier niet in overeenstemming is met dit besluit en de kennisgever daarvan overeenkomstig artikel 5, § 5, in kennis stelt, mag de stof pas dertig dagen nadat de Minister de gegevens heeft ontvangen waarmee de kennisgeving in overeenstemming met dit besluit kan worden gebracht, op de markt worden gebracht. Is de kennisgever overeenkomstig artikel 5, § 5, meegedeeld dat het dossier aanvaard is, dan mag de stof ten vroegste vijftien dagen na ontvangst van het dossier door de Minister op de markt worden gebracht.

dossier contient les informations et résultats des études visées à l'annexe VII B, mais comportera, également, une description complète et détaillée des études réalisées et des méthodes employées ou de leurs références bibliographiques;

b) toutes les informations prévues à l'article 2, § 1^{er}, 1°, autres que celles visées à l'article 2, § 1^{er}, 1°, A, a.

2° Lorsque les quantités mises sur le marché sont inférieures à 100 kilogrammes par an et par fabricant, le notifiant peut, sans préjudice des dispositions de l'article 2, § 1^{er}, 1°, réduire les informations de ladite notification concernant le dossier technique, à celles prévues à l'annexe VII C.

3° Lorsqu'il a soumis un dossier de notification réduit, conformément à l'article 2, § 2, 2°, le notifiant devra, avant que la quantité de substance, mise sur le marché, n'atteigne 100 kilogrammes par an et par fabricant ou que la quantité totale, mise sur le marché, n'atteigne 500 kilogrammes par fabricant, fournir au Ministre les informations complémentaires nécessaires pour compléter le dossier technique jusqu'au niveau prévu à l'annexe VII B et fournir une adaptation du résumé du dossier comme prévu à l'article 2, § 1^{er}, 1°, B.

4° De même, lorsqu'il a soumis un dossier de notification réduit conformément à l'article 2, § 2, 1°, le notifiant devra, avant que la quantité de la substance, mise sur le marché, n'atteigne 1 tonne par an et par fabricant ou que la quantité totale mise sur le marché n'atteigne 5 tonnes par fabricant, soumettre une notification complète conformément aux dispositions de l'article 2, § 1^{er}.

5° Les substances, notifiées conformément à l'article 2, § 2, 1° et 2°, doivent, dans la mesure où l'on peut raisonnablement supposer que le notifiant connaît leurs propriétés dangereuses, être emballées et provisoirement étiquetées conformément aux règles prévues aux articles 7 et 8 et aux critères énoncés à l'annexe VI. Au cas où il ne serait pas encore possible de les étiqueter selon le principe défini à l'article 8, § 1^{er}, l'étiquette devra porter en plus de l'étiquetage découlant des essais déjà réalisés, la mention suivante : « Attention ! Substance non encore testée complètement ».

§ 3. Substances déjà notifiées selon la procédure de notification harmonisée (règle des dix ans). Le notifiant est dispensé de fournir les informations requises conformément à l'article 2, §§ 1^{er} et 2, pour le dossier technique, visé aux annexes VII A, VII B, VII C ou VII D, à l'exception des points 1 et 2 de ces annexes, si les données de notifications ont été introduites depuis dix ans.

§ 4. Mise sur le marché des substances notifiées :

1° En l'absence d'indications contraires de la part du Ministre, les substances ayant fait l'objet d'une notification conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, peuvent être mises sur le marché au plus tôt soixante jours après réception, par le Ministre, d'un dossier conforme aux exigences du présent arrêté.

Si le Ministre juge que le dossier n'est pas conforme au présent arrêté et en avise le notifiant, conformément à l'article 5, § 4, la substance ne peut être mise sur le marché que soixante jours après réception, par le Ministre, des éléments permettant de rendre la notification conforme au présent arrêté.

2° En l'absence d'indications contraires de la part du Ministre, les substances ayant fait l'objet d'une notification conformément à l'article 2, § 2, 1° ou 2°, peuvent être mises sur le marché au plus tôt trente jours après réception, par le Ministre, d'un dossier conforme aux exigences du présent arrêté.

Si le Ministre juge que le dossier n'est pas conforme au présent arrêté et en avise le notifiant, conformément à l'article 5, § 5, la substance ne peut être mise sur le marché que trente jours après réception, par le Ministre, des éléments permettant de rendre la notification conforme au présent arrêté. Toutefois, si le notifiant a été avisé, conformément à l'article 5, § 5, que le dossier a été accepté, la substance peut être mise sur le marché au plus tôt quinze jours après réception du dossier par le Ministre.

§ 5. Wanneer voor buiten de Europese Unie vervaardigde stoffen meer dan één kennisgeving wordt gedaan voor een door dezelfde fabrikant vervaardigde stof, worden de jaarlijkse en cumulatieve in de Europese Unie op de markt gebrachte hoeveelheden vastgesteld aan de hand van de krachtens artikel 2, § 1, 1°, artikel 2, § 2, 1°, en artikel 2, § 9, verstrekte informatie. De verplichting om aanvullende proeven te verrichten als bepaald in artikel 2, § 1, 2°, geldt voor de gezamenlijke kennisgevers.

§ 6. Wat betreft polymeren worden de in de kennisgevingen opgenomen specifieke bepalingen betreffende de technische dossiers zoals bepaald in artikel 2, § 1, 1°, en artikel 2, § 2, 1°, opgesteld overeenkomstig bijlage VII D.

§ 7. Vrijstellingen :

1° Artikel 2, §§ 1 en 2, en artikel 4, §§ 1 en 2, zijn niet van toepassing op de volgende stoffen :

- a) stoffen die zijn opgenomen in EINECS;
- b) toevoegingsmiddelen en stoffen die uitsluitend bestemd zijn voor gebruik in diervoeders;
- c) stoffen die uitsluitend bestemd zijn voor gebruik als toevoegingsmiddel in levensmiddelen en stoffen die uitsluitend bestemd zijn voor gebruik als aroma in levensmiddelen;
- d) werkzame bestanddelen die uitsluitend bestemd zijn voor gebruik in geneesmiddelen als bedoeld in artikel 1, § 2, 1°, a). Hieronder vallen niet de chemische tussenproducten;
- e) stoffen die uitsluitend bestemd zijn voor gebruik voor andere categorieën van producten waarvoor communautaire kennisgevings- of erkenningsprocedures bestaan en waarvoor de eisen betreffende de te verstrekken informatie gelijkwaardig zijn aan die van dit besluit.

Deze lijst van categorieën van producten bestaat uit de werkzame stoffen van de gewasbeschermingsmiddelen onderworpen aan de evaluatieprocedure voorzien door het koninklijk besluit van 28 februari 1994 betreffende het bewaren, het op de markt brengen en het gebruiken van bestrijdingsmiddelen voor landbouwkundig gebruik.

Indien nodig kan de Minister deze lijst aanpassen.

2° Van de hierna genoemde stoffen wordt geacht kennisgeving te zijn gedaan in de zin van dit besluit, wanneer aan de volgende voorwaarden is voldaan :

- a) polymeren, indien zij vervaardigd zijn met gebruikmaking van minder dan twee gewichtspercenten, in gebonden vorm, van een stof die niet in EINECS is opgenomen;
- b) stoffen die in kleinere hoeveelheden dan 10 kilogram per jaar per fabrikant op de markt worden gebracht, mits de fabrikant/ importeur voldoet aan alle eisen van de Minister. Deze eisen mogen niet verder reiken dan de in bijlage VII C, punten 1 en 2, bedoelde informatie;
- c) stoffen die in beperkte hoeveelheden, in geen geval meer dan 100 kilogram per fabrikant per jaar, op de markt worden gebracht en uitsluitend voor wetenschappelijk onderzoek en ontwikkeling in gecontroleerde omstandigheden zijn bestemd. Elke fabrikant of importeur die van deze uitzondering gebruik maakt, moet de identiteit van de stof, de voor het kenmerken gebruikte gegevens, de hoeveelheden en de afnemers schriftelijk registreren. Deze informatie wordt op verzoek ter beschikking gesteld van de Minister;
- d) stoffen die op de markt worden gebracht voor produktiegericht onderzoek en ontwikkeling en die in tot dit doel beperkte hoeveelheden aan een beperkt aantal geregistreerde afnemers worden afgeleverd. Deze stoffen komen in aanmerking voor een vrijstelling van één jaar op voorwaarde dat de fabrikant of importeur de identiteit ervan, de voor het kenmerken gebruikte gegevens, de hoeveelheid, de motivering van de hoeveelheid, een lijst van afnemers en het programma inzake onderzoek en ontwikkeling opgeeft aan de Minister en zich voegt naar de opgelegde bepalingen met betrekking tot onderzoek en ontwikkeling. De opgelegde bepalingen kunnen informatie betreffen die niet

§ 5. Lorsque, pour les substances fabriquées en dehors de l'Union européenne, il y a plus d'une notification pour une substance produite par le même fabricant, les quantités annuelles cumulées, mises sur le marché de l'Union européenne, sont déterminées sur la base des informations communiquées conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1°, et à l'article 2, § 9. L'obligation d'effectuer des essais complémentaires conformément à l'article 2, § 1^{er}, 2°, s'adresse, de manière collective, à tous les notifiants.

§ 6. En ce qui concerne les polymères, les dispositions spécifiques relatives aux dossiers techniques contenus dans les notifications et visés à l'article 2, § 1^{er}, 1°, et à l'article 2, § 2, 1°, sont établies conformément à l'annexe VII D.

§ 7. Exemptions :

1° Les substances suivantes sont exemptées des dispositions de l'article 2, §§ 1^{er} et 2, et de l'article 4, §§ 1^{er} et 2 :

- a) les substances qui figurent dans l'EINECS;
- b) les additifs et substances exclusivement utilisés dans l'alimentation animale;
- c) les substances exclusivement utilisées comme additifs des denrées alimentaires et les substances utilisées, exclusivement, comme arômes dans les denrées alimentaires;
- d) les ingrédients actifs, utilisés, exclusivement, pour les médicaments visés à l'article 1^{er}, § 2, 1°, a). Ceci ne comprend pas les produits chimiques intermédiaires;
- e) les substances utilisées exclusivement pour d'autres catégories de produits pour lesquels existent des procédures communautaires de notification ou d'homologation et pour lesquels les exigences relatives aux informations à présenter sont égales à celles prévues par le présent arrêté.

Cette liste de catégories de produits comprend les substances actives des produits phytopharmaceutiques soumises à la procédure d'évaluation prévue par l'arrêté royal du 28 février 1994 relatif à la conservation, à la mise sur le marché et à l'utilisation des pesticides à usage agricole.

Au besoin, le Ministre pourra adapter cette liste.

2° Les substances, énumérées ci-après, sont considérées comme notifiées, au sens du présent arrêté, lorsque les conditions suivantes sont remplies :

- a) les polymères, à l'exception de ceux contenant 2 % ou plus, sous forme liée, de toute substance non reprise dans l'EINECS;
- b) les substances mises sur le marché en quantité inférieure à 10 kilogrammes par an et par fabricant, pour autant que le fabricant/importateur satisfasse à toutes les conditions imposées par le Ministre. Ces conditions se limitent aux informations prévues à l'annexe VII C, points 1 et 2;
- c) les substances mises sur le marché en quantité limitée, en tout cas n'excédant pas 100 kilogrammes par fabricant et par an, prévues exclusivement à des fins de recherche et développement scientifiques sous contrôle. Tout fabricant ou importateur faisant usage de cette dérogation doit tenir un registre reprenant l'identité de la substance, les données d'étiquetage, les quantités et une liste des clients. Cette information est mise à la disposition du Ministre, sur simple demande de sa part;
- d) substances mises sur le marché à des fins de recherche et de développement de production en des quantités limitées aux besoins de la recherche et du développement de production auprès de clients enregistrés et en nombre limité. Ces substances bénéficient d'une exemption d'un an, à condition que le fabricant ou l'importateur communique leur identité, leurs données d'étiquetage, leur quantité, la justification de la quantité, la liste des clients et le programme de recherche, et de développement, au Ministre et qu'il se conforme à toute condition imposée par le Ministre concernant cette recherche et

verder mag reiken dan die bedoeld in artikel 2, § 2. Na verloop van één jaar wordt van die stoffen op de gebruikelijke wijze kennis gegeven. De fabrikant of importeur dient eveneens de verzekering te geven dat de stof of het preparaat waarin deze is verwerkt, uitsluitend door het personeel van de afnemende bedrijven in gecontroleerde omstandigheden zal worden gebruikt en niet als zodanig of verwerkt in een preparaat ter beschikking van het publiek zal worden gesteld. Zo de Minister bovendien oordeelt dat er een onaanvaardbaar risico voor mens of milieu kan bestaan, geldt bovengenoemde beperking eveneens voor elk produkt dat de nieuwe stof bevat en dat is vervaardigd tijdens het produktiegericht onderzoek en ontwikkeling. Bovengenoemde vrijstelling van één jaar kan in uitzonderlijke omstandigheden met een jaar worden verlengd, indien de kennisgever ten genoegen van de Minister kan aantonen dat een dergelijke verlenging gerechtvaardigd is.

3° De in artikel 2, § 7, 2°, bedoelde stoffen moeten, voor zover de fabrikant redelijkerwijs kennis heeft van hun gevaarlijke eigenschappen, door de fabrikant of diens vertegenwoordiger worden verpakt en voorlopig gekenmerkt overeenkomstig artikel 7 en 8 en de criteria van bijlage VI.

Indien zij niet volledig kunnen worden gekenmerkt omdat niet alle resultaten van de in bijlage VII A bedoelde proeven beschikbaar zijn, moet overeenkomstig de beginselen van artikel 8, § 1, op het etiket, benevens de aanduidingen op grond van reeds uitgevoerde proeven, de waarschuwing « Opgelet ! Nog niet volledig geteste stof » worden aangebracht.

4° Indien een in artikel 2, § 7, 2°, bedoelde stof, gekenmerkt volgens de beginselen van artikel 8, § 1, op basis van de beschikbare kennis zeer vergiftig, vergiftig, kankerverwekkend, voor de voortplanting vergiftig of mutageen is, dient de fabrikant of de importeur van de stof de Minister in kennis te stellen van iedere relevante informatie met betrekking tot de punten 2.3, 2.4, en 2.5, van bijlage VII A. Voorts moeten gegevens over acute toxiciteit worden verstrekt indien deze voorhanden zijn.

§ 8. De kennisgevingen gedaan volgens het koninklijk besluit van 24 mei 1982 worden beschouwd als zijnde gedaan volgens de Europese geharmoniseerde kennisgevingsprocedure. Deze kennisgevingen blijven geldig totdat de totale toegelaten hoeveelheid op de communautaire markt wordt overschreden. Op dat ogenblik dient een kennisgeving te gebeuren volgens de criteria van dit besluit. De beperkte kennisgevingen die in België werden ingediend volgens artikel 9, § 1, d, van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 vallen niet onder de Europese geharmoniseerde kennisgevingsprocedure en worden niet opgenomen in ELINCS. Deze kennisgevingen blijven geldig op het Belgisch grondgebied zolang zij worden verdeeld binnen de jaarlijks op de markt toegelaten gebrachte hoeveelheid en verder aan de opgelegde voorwaarden wordt voldaan. Zodra een kennisgeving wordt gedaan door de fabrikant of door één van zijn afnemers of zodra een stof op de markt wordt gebracht volgens de in dit besluit beschreven methode vervallen alle oude voor deze stof gedane kennisgevingen, ingediend volgens het koninklijk besluit van 24 mei 1982 en gelden de bepalingen van dit besluit. Dit laatste geldt met terugwerkende kracht daar waar een beperkte kennisgeving volgens artikel 9, § 1, d, van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 in België werd goedgekeurd in de periode dat het produkt reeds door andere bevoegde overheden werd aanvaard volgens de geharmoniseerde procedure.

§ 9. Bijwerken van de informatie :

1° Elke kennisgever van een stof waarvan reeds overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, of artikel 2, § 2, 1°, kennisgeving is gedaan, moet de bevoegde overheid waaraan de oorspronkelijke kennisgeving werd gedaan, uit eigen beweging en onder zijn verantwoordelijkheid schriftelijk op de hoogte brengen van :

— veranderingen in de hoeveelheid per jaar of in het totaal van de hoeveelheden die door hem of, indien het om een buiten de Europese Unie vervaardigde stof gaat en de kennisgever hiervoor als alleenverantwoordiger is aangewezen, door hem en/of door anderen op de markt worden gebracht;

— nieuwe kennis van de gevolgen van de stof voor mens en/of milieu waarvan ook de kennisgever redelijkerwijze kennis moet hebben gekregen en de resultaten van de overeenkomstig bijlage VIII verrichte studies;

développement. Les conditions imposées peuvent inclure des informations n'excédant pas les informations prévues à l'article 2, § 2. Au-delà du délai d'un an, ces substances sont, normalement, soumises à notification. Le fabricant ou importateur est, également, tenu de donner l'assurance que la substance, ou la préparation à laquelle elle est incorporée, sera manipulée, sous contrôle, exclusivement par le personnel des clients et qu'elle ne sera pas mise à la disposition du public, ni en tant que telle, ni dans une préparation. De plus, si le Ministre considère qu'il peut exister un risque inacceptable pour l'homme ou l'environnement, il peut étendre la restriction, visée ci-dessus, en incluant tout produit contenant la nouvelle substance et fabriquée au cours de la recherche et du développement de production. Le dit délai d'exemption d'un an peut, dans des circonstances exceptionnelles, être prorogé d'un an, si le notifiant peut démontrer, à la satisfaction du Ministre, que cette prorogation se justifie.

3° Les substances visées à l'article 2, § 7, 2°, doivent, dans la mesure où leurs propriétés dangereuses sont raisonnablement connues du fabricant, être emballées et provisoirement étiquetées par le fabricant ou son représentant conformément aux règles prévues aux articles 7 et 8 et aux critères fixés à l'annexe VI.

Au cas où, parce que les résultats des essais prévus à l'annexe VII A ne sont pas tous disponibles, il ne serait pas possible de les étiqueter complètement et selon les principes définis à l'article 8, § 1^{er}, l'étiquette devra porter, en plus de l'étiquetage découlant des essais déjà réalisés, la mention « Attention ! Substance non encore testée complètement ».

4° Si une substance, visée à l'article 2, § 7, 2°, est étiquetée selon les principes définis à l'article 8, § 1^{er}, sur la base des connaissances disponibles, très toxique, toxique, cancérigène, toxique pour la reproduction ou mutagène, le fabricant ou l'importateur de cette substance doit communiquer, au Ministre, toute information appropriée concernant l'annexe VII A, points 2.3, 2.4, et 2.5. En outre, il communique les données relatives à la toxicité aiguë lorsqu'elles sont disponibles.

§ 8. Les notifications, introduites conformément à l'arrêté royal du 24 mai 1982, sont considérées comme étant effectuées selon la procédure de notification européenne harmonisée. Ces notifications restent valables tant que la quantité totale autorisée à être mise sur le marché communautaire n'est pas dépassée. En cas de dépassement, une notification doit être faite selon les critères imposés par le présent arrêté. Les notifications réduites, introduites en Belgique conformément à l'article 9, § 1^{er}, d, de l'arrêté royal du 24 mai 1982 ne tombent pas sous le couvert de la procédure de notification européenne harmonisée et ne sont pas reprises dans ELINCS. Ces notifications restent valables sur le territoire belge tant que les quantités annuelles autorisées mises sur le marché ne sont pas dépassées et que les conditions imposées sont respectées. Dès qu'une notification est introduite par le fabricant ou par un de ses clients ou dès que la mise sur le marché d'une substance a lieu selon les principes décrits dans le présent arrêté, toutes les anciennes notifications se rapportant à cette substance, introduites aux termes de l'arrêté royal du 24 mai 1982, deviennent automatiquement caduques et les dispositions du présent arrêté sont d'application. Le présent arrêté a des effets rétroactifs dans le cas où une notification réduite, introduite aux termes de l'article 9, § 1^{er}, d, de l'arrêté royal du 24 mai 1982 a été considérée comme recevable en Belgique pendant la période au cours de laquelle une notification relative à cette substance a déjà été acceptée par d'autres autorités compétentes selon la procédure harmonisée.

§ 9. Informations ultérieures :

1° Tout notifiant d'une substance déjà notifiée selon l'article 2, § 1^{er}, 1° ou l'article 2, § 2, 1°, est tenu d'informer, par écrit, de sa propre initiative et sous sa responsabilité, l'autorité compétente à laquelle la notification initiale a été soumise :

— des changements des quantités annuelles ou cumulées mises sur le marché par lui, ou, dans le cas d'une substance fabriquée en dehors de l'Union européenne, pour laquelle le notifiant a été désigné comme représentant exclusif, par lui et/ou par d'autres;

— des nouvelles connaissances sur les effets de la substance sur l'homme et/ou l'environnement dont il est raisonnablement sensé être au courant et des résultats des essais effectués conformément à l'annexe VIII;

— nieuwe gebruiksdoeleinden waarvoor de stof op de markt wordt gebracht en waarvan hij redelijkerwijze kennis moet hebben gekregen;

— wijzigingen in de samenstelling van de stof als bedoeld in bijlagen VII A, VII B, VII C of VII D, punten 1.3;

— elke verandering in zijn hoedanigheid (fabrikant of importeur) alsook elke adreswijziging.

2° Iedere importeur van een stof die door een buiten de Europese Unie gevestigde fabrikant is vervaardigd en die deze stof invoert in het kader van een kennisgeving gedaan door een persoon die overeenkomstig artikel 1, § 3, d), als enige vertegenwoordiger optreedt, moet zich ervan vergewissen dat die vertegenwoordiger over bijgewerkte gegevens beschikt over de hoeveelheden van de stof die de importeur in de Europese Unie op de markt heeft gebracht.

Art. 3. § 1. Onderzoek en beoordeling van de eigenschappen van stoffen :

De in het kader van dit besluit uitgevoerde proeven op chemische stoffen worden doorgaans uitgevoerd volgens de in bijlage V omschreven methodes. De fysisch-chemische eigenschappen van de stoffen worden vastgesteld volgens de in bijlage V A, genoemde methodes. Hun toxiciteit wordt bepaald volgens de in bijlage V B, genoemde methodes en hun ecotoxiciteit volgens de in bijlage V C, genoemde methodes. Het kan echter voorkomen dat voor sommige stoffen die zijn opgenomen in EINECS gegevens zijn verkregen tijdens proeven volgens andere dan de in bijlage V omschreven methodes. Rekening houdend met onder andere de noodzaak de proeven met gewervelde dieren tot het minimum te beperken zal per geval worden bepaald of deze gegevens volstaan, gelet op de eisen betreffende de indeling en het kenmerken, dan wel of aanvullende proeven overeenkomstig bijlage V moeten worden verricht.

De laboratoriumproeven moeten worden uitgevoerd overeenkomstig het koninklijk besluit van 27 oktober 1988 betreffende de toepassing van de beginselen van goede laboratoriumpraktijken en het toezicht op de uitvoering ervan bij proeven op scheikundige stoffen en de bepalingen van het koninklijk besluit van 14 november 1993 betreffende de bescherming van proefdieren.

§ 2. Feitelijke of potentiële risico van stoffen en algemene beginselen die gelden bij de beoordeling van de door stoffen veroorzaakte risico's voor mens en milieu :

1° Beginselen van de risicobeoordeling :

1) De risicobeoordeling omvat een omschrijving van de gevaren en, zo nodig, een evaluatie van de dosis-respons (of concentratie-effect) relatie, een evaluatie van de blootstelling en een karakterisering van het risico. In de regel worden zij uitgevoerd overeenkomstig de procedures van artikel 3, § 2, 2° en 3°.

2) Onverminderd het bepaalde in artikel 3, § 2, 1°, 1), worden met betrekking tot specifieke effecten als de aantasting van de ozonlaag, waarvoor de procedures van artikel 3, § 2, 2° en 3°, onuitvoerbaar zijn, de daaraan verbonden risico's geval per geval beoordeeld en neemt de Minister een uitvoerige uiteenzetting en motivering van deze beoordeling op in het schriftelijk rapport dat de Europese Commissie wordt toegezonden overeenkomstig artikel 3, § 2, 5°.

3) Bij het uitvoeren van de evaluatie van de blootstelling richt de Minister de aandacht op die menselijke populaties of milieucompartimenten die in het licht van de beschikbare gegevens over de stof en met name de opslag, de formulering van preparaten of andere vormen van verwerking, het gebruik en de verwijdering of het hergebruik daarvan, redelijkerwijs geacht kunnen worden aan de bedoelde stof te zullen worden blootgesteld.

4) De risicobeoordeling resulteert in één of meer van de volgende conclusies :

a) de stof geeft niet meteen aanleiding tot bezorgdheid en hoeft niet verder onderzocht te worden totdat overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, artikel 2, § 2, 3° en 4°, of artikel 2, § 9, 1°, aanvullende gegevens zijn verstrekt;

— des usages nouveaux pour lesquels la substance est mise sur le marché, dont il est raisonnablement sensé être au courant;

— de toute modification de la composition de la substance, au sens des annexes VII A, VII B, VII C ou VII D, points 1, 3;

— de tout changement de son statut (fabricant ou importateur) et de tout changement d'adresse.

2° Tout importateur d'une substance produite par un fabricant établi hors de l'Union européenne qui importe cette substance dans le cadre d'une notification soumise préalablement par un représentant exclusif conformément à l'article 1^{er}, § 3, d), est requis de s'assurer que ledit représentant exclusif dispose d'informations à jour sur les quantités de la substance qu'il a introduites sur le marché de l'Union européenne.

Art. 3. § 1^{er}. Essais et évaluation des propriétés des substances :

Les essais des produits chimiques réalisés, dans le cadre du présent arrêté, sont, en règle générale, effectués conformément aux méthodes définies à l'annexe V. Les propriétés physico-chimiques des substances sont déterminées selon les méthodes prévues à l'annexe V, partie A. Leur toxicité est déterminée selon les méthodes prévues à l'annexe V, partie B, et leur écotoxicité selon les méthodes prévues à l'annexe V, partie C. Il se peut, cependant, que, pour certaines substances inscrites dans EINECS, des données aient été obtenues lors d'essais par des méthodes autres que celles définies à l'annexe V. Il sera décidé, cas par cas, en tenant compte, entre autres facteurs, de la nécessité de réduire, au minimum, les essais sur les animaux vertébrés, si ces données sont suffisantes, eu égard aux exigences relatives à la classification et à l'étiquetage ou si des essais complémentaires doivent être effectués conformément à l'annexe V.

Les essais de laboratoire doivent être exécutés conformément à l'arrêté royal du 27 octobre 1988 relatif à l'application des principes de bonnes pratiques de laboratoire et à la vérification de sa mise en application pour les essais effectués sur les substances chimiques et aux dispositions de l'arrêté royal du 14 novembre 1993 relatif à la protection des animaux d'expérience.

§ 2. Risques réels ou potentiels des substances et principes généraux régissant l'évaluation des risques des substances pour l'homme et pour l'environnement :

1° Principes d'évaluation des risques :

1) L'évaluation des risques comprend l'identification du danger et, le cas échéant, l'évaluation de la relation dose-réponse (concentration-effet), l'évaluation de l'exposition et la caractérisation des risques. Elle est normalement effectuée conformément aux procédures prévues à l'article 3, § 2, 2° et 3°.

2) Sans préjudice de l'article 3, § 2, 1°, 1), les risques associés à des effets particuliers, tels que l'appauvrissement de la couche d'ozone, pour lesquels il est impossible, dans la pratique, de suivre les procédures fixées à l'article 3, § 2, 2° et 3°, sont évalués cas par cas et le Ministre insère un compte rendu complet et une justification de ces évaluations dans le rapport écrit transmis à la Commission européenne conformément à l'article 3, § 2, 5°.

3) Lors de l'évaluation de l'exposition, le Ministre tient compte des populations humaines ou des composantes de l'environnement dont l'exposition à la substance est raisonnablement prévisible à la lumière des informations disponibles sur la substance, et plus particulièrement sur son stockage, son incorporation dans une préparation ou son utilisation dans un autre procédé, son usage et son élimination ou sa récupération.

4) L'évaluation des risques aboutit à une ou à plusieurs des conclusions suivantes :

a) la substance ne pose pas de problème dans l'immédiat et ne demande pas à être étudiée plus avant tant que des informations complémentaires ne sont pas communiquées conformément à l'article 2, § 1^{er}, 2°, à l'article 2, § 2, 3° et 4°, ou à l'article 2, § 9, 1°;

b) de stof geeft aanleiding tot bezorgdheid en de Minister dient te bepalen welke aanvullende gegevens vereist zijn voor een herziening van de beoordeling maar wacht met het opvragen van deze gegevens tot de op de markt gebrachte hoeveelheid de volgende drempelwaarde, als bepaald in artikel 2, § 1, 2°, en artikel 2, § 2, 3° of 4°, heeft bereikt;

c) de stof geeft aanleiding tot bezorgdheid en er dienen onmiddellijk nadere gegevens te worden opgevraagd;

d) de stof geeft aanleiding tot bezorgdheid en de Minister dient onverwijld aanbevelingen te formuleren ter beperking van het risico.

5) Als uit de risicobeoordeling blijkt dat bepaalde in artikel 3, § 2, 1°, 4), b), c) of d), genoemde conclusies van toepassing zijn, brengt de Minister de kennisgever van zijn conclusies op de hoogte en biedt hem de gelegenheid commentaar bij deze conclusies te geven en aanvullende gegevens te verstrekken. De Minister maakt gebruik van alle relevante gegevens om de risicobeoordeling te herzien alvorens hij deze aan de Europese Commissie toestuurt.

6) Wanneer de Minister aanbevelingen doet ter beperking van het aan een stof verbonden risico, houdt hij rekening met de mogelijkheid dat een vermindering van de blootstelling van bepaalde menselijke populaties of milieucompartimenten kan resulteren in een verhoogde blootstelling van andere menselijke populaties of milieucompartimenten.

2° Risicobeoordeling : gezondheid :

1) Voor elke overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, en artikel 2, § 2, 1° of 2°, aangegeven stof voert de Minister een risicobeoordeling uit, waarvan het eerste onderdeel een omschrijving van de gevaren is die ten minste betrekking heeft op de in bijlage ERB I, deel A, en bijlage ERB II, deel A, genoemde eigenschappen en potentiële ongewenste effecten. Daarna gaat de Minister over tot de volgende reeks van taken uitgevoerd overeenkomstig de bepalingen van de bijlage ERB I, deel B, en bijlage ERB II, deel B :

a)- zo nodig, evaluatie van de dosis-respons (of concentratie-effect) relatie;

- evaluatie van de blootstelling van elke menselijke populatie die kans loopt met de stof in aanraking te komen (werknemers, consumenten en de via het milieu indirect blootgestelde bevolking);

b) karakterisering van het risico.

2) Van de eisen van artikel 3, § 2, 2°, 1, kan worden afgeweken in volgende gevallen :

a) als de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap is uitgevoerd en de resultaten niet hebben geleid tot de indeling van de stof in het kader van dit besluit, hoeft de risicobeoordeling met betrekking tot dat effect of die eigenschap niet de in artikel 3, § 2, 2°, 1), a) en b), bedoelde taken te omvatten en is de in artikel 3, § 2, 1°, 4), a), genoemde conclusie van toepassing tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid zijn;

en

b) als de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap nog niet is uitgevoerd, hoeft met dat effect of die bepaalde eigenschap bij de risicobeoordeling geen rekening te worden gehouden tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid zijn.

3° Risicobeoordeling : milieu :

1) Voor elke stof die is aangegeven overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, artikel 2, § 2, 1° of 2°, wordt een risicobeoordeling uitgevoerd met betrekking tot de milieu-effecten van de stof, waarvan het eerste

b) la substance pose un problème et le Ministre décide quels sont les renseignements complémentaires nécessaires pour réviser l'évaluation, mais il diffère la demande d'information jusqu'au moment où la quantité mise sur le marché atteint le seuil de tonnage suivant, prévu à l'article 2, § 1^{er}, 2°, et à l'article 2, § 2, 3° ou 4°;

c) la substance pose un problème et des renseignements complémentaires doivent être demandés immédiatement;

d) la substance pose un problème et le Ministre fait, immédiatement, des recommandations concernant la réduction des risques.

5) Lorsque l'évaluation des risques aboutit à l'une des conclusions visées à l'article 3, § 2, 1°, 4), b), c) ou d), le Ministre informe le notifiant de ses conclusions et lui donne la possibilité de présenter ses observations, à ce sujet, et de fournir des renseignements complémentaires. Le Ministre utilise toute information pertinente pour réviser l'évaluation des risques avant de la communiquer à la Commission européenne.

6) Lorsque le Ministre formule des recommandations concernant la réduction des risques liés à une substance, il tient compte du fait que la réduction de l'exposition de certaines populations humaines ou de certaines composantes de l'environnement peut augmenter l'exposition d'autres populations humaines ou d'autres composantes de l'environnement.

2° Evaluation des risques : santé humaine :

1) Pour chaque substance, notifiée conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1° ou 2°, le Ministre effectue une évaluation des risques dont la première étape consiste en l'identification des dangers et couvre, au minimum, les propriétés et les effets indésirables potentiels figurant à l'annexe ERB I, partie A, et à l'annexe ERB II, partie A. Ensuite, le Ministre procède à la série de travaux suivante, qui est exécutée conformément aux lignes directrices données à l'annexe ERB I, partie B, et à l'annexe ERB II, partie B :

a) -le cas échéant, évaluation du rapport dose-réponse (ou concentration-effet);

- évaluation de l'exposition à laquelle des populations humaines (les travailleurs, les consommateurs et l'homme exposés indirectement via l'environnement) sont susceptibles d'être soumises;

b) caractérisation du risque.

2) Il peut être dérogé aux exigences de l'article 3, § 2, 2°, 1, dans les cas suivants :

a) lorsque l'essai, destiné à identifier le danger associé à un effet ou une propriété particulière, a été effectué et que les résultats n'ont pas conduit à une classification de la substance conformément au présent arrêté, une évaluation du risque, lié à cet effet ou à cette propriété, ne doit pas comprendre les travaux prévus à l'article 3, § 2, 2°, 1), a) et b), et l'on aboutit à la conclusion de l'article 3, § 2, 1°, 4), a), à moins que l'on ait d'autres doutes fondés;

et

b) lorsque l'essai, destiné à identifier le danger associé à un effet ou une propriété particulière, n'a pas encore été effectué, cet effet ou cette propriété particulière, n'est pas pris en considération dans l'évaluation des risques, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés.

3° Evaluation des risques : environnement :

1) Pour chaque substance notifiée conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, à l'article 2, § 2, 1° ou 2°, est effectuée une évaluation des risques liés à ses effets sur l'environnement dont la première étape consiste en

onderdeel een omschrijving van de gevaren is. Nadat de gevaren omschreven werden, worden de volgende reeks van taken uitgevoerd overeenkomstig de bepalingen van bijlage ERB III :

- a) - zo nodig, evaluatie van de dosis-respons (of concentratie-effect) relatie;
- evaluatie van de blootstelling van de milieucompartimenten (het aquatische milieu, het terrestrische milieu en de atmosfeer) die de kans lopen aan de stof te worden blootgesteld;

b) karakterisering van het risico.

2) Van de eisen van artikel 3, § 2, 3°, 1), kan worden afgeweken in volgende gevallen :

a) voor stoffen die zijn aangegeven overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, maar die niet als gevaarlijk voor het milieu zijn ingedeeld, hoeft de risicobeoordeling niet de in artikel 3, § 2, 3°, 1), a) en b), bedoelde taken te omvatten en is de in artikel 3, § 2, 1°, 4), a), genoemde conclusie van toepassing tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid zijn;

en

b) voor stoffen die zijn aangegeven overeenkomstig artikel 2, § 2, 1° of 2°, moet er, indien er onvoldoende gegevens zijn om te bepalen of zij als gevaarlijk voor het milieu dienen te worden ingedeeld, bij de omschrijving van de gevaren worden nagegaan of er op basis van andere gegevens, bij voorbeeld gegevens over fysisch-chemische en toxische eigenschappen, goede redenen tot bezorgdheid met betrekking tot milieu-effecten bestaan. Tenzij dergelijke goede redenen voorhanden zijn, hoeft de risicobeoordeling niet de in artikel 3, § 2, 3°, 1), a) en b), bedoelde taken te omvatten en is de in artikel 3, § 2, 1°, 4), a), genoemde conclusie van toepassing.

4° Conclusies van de risicobeoordeling :

1) Nadat overeenkomstig artikel 3, § 2, 2° en 3°, en volgens de bepalingen in de bijlagen ERB I, ERB II en ERB III, een risicobeoordeling werd uitgevoerd, wordt overeenkomstig bijlage ERB IV bepaald welke van de vier in artikel 3, § 2, 1°, 4), genoemde conclusie(s) van toepassing is of zijn en worden zo nodig de in artikel 3, § 2, 1°, 5), genoemde maatregelen genomen.

2) Indien aanvullende gegevens zijn verstrekt overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, artikel 2, § 2, 3° en 4°, artikel 2, § 9, 1°, of artikel 5 of op een andere wijze, wordt de risicobeoordeling, uitgevoerd in overeenstemming met artikel 3, § 2, 2° en 3°, en volgens de bepalingen in de bijlagen ERB I, ERB II en ERB III, opnieuw bezien en zo nodig gewijzigd.

5° Inhoud van het schriftelijk rapport aan de Europese Commissie :

1) Nadat overeenkomstig artikel 3, § 2, 2° en 3°, een risicobeoordeling werd uitgevoerd en overeenkomstig artikel 3, § 2, 4°, daaruit conclusies werden getrokken, wordt een schriftelijk rapport opgesteld dat ten minste de in bijlage ERB V genoemde gegevens bevat. Dit rapport wordt aan de Europese Commissie toegezonden. Bij elke herziening van de beoordeling in het licht van aanvullende gegevens wordt het bijgewerkt. Het bijgewerkte rapport wordt aan de Europese Commissie toegezonden.

2) Wanneer de bevoegde instanties overeenstemming hebben bereikt over het schriftelijk rapport van de risicobeoordeling of een herziening daarvan, wordt op verzoek een kopie daarvan ter beschikking van de kennisgever gesteld.

6° De algemene beginselen van de risicobeoordeling zijn opgenomen in de ERB-bijlagen bij dit besluit.

De Minister kan op elk ogenblik de ERB-bijlagen van dit besluit aanpassen aan de nieuwe voorschriften van de Europese Unie.

l'identification des dangers. Ensuite, il est procédé à la série de travaux suivante, qui est exécutée conformément aux lignes directrices données à l'annexe ERB III :

a) - le cas échéant, évaluation du rapport dose-réponse (concentration-effet);

- évaluation de l'exposition à laquelle des composantes de l'environnement (le milieu aquatique, le milieu terrestre et l'air) sont susceptibles d'être soumises;

b) caractérisation du risque.

2) Il peut être dérogé aux exigences de l'article 3, § 2, 3°, 1), dans les cas suivants :

a) pour les substances notifiées conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, mais qui ne sont pas classées dans la catégorie des substances dangereuses pour l'environnement, l'évaluation des risques ne doit pas comprendre les travaux prévus à l'article 3, § 2, 3°, 1), a) et b), et l'on aboutit à la conclusion de l'article 3, § 2, 1°, 4), a), à moins que l'on ait d'autres doutes fondés;

et

b) pour les substances notifiées conformément à l'article 2, § 2, 1° ou 2°, si l'on ne dispose pas de données suffisantes pour déterminer s'il y a lieu de les classer dans la catégorie des substances dangereuses pour l'environnement, il convient, au stade de l'identification des dangers, d'établir, sur la base d'autres données, par exemple des données sur les propriétés physico-chimiques et les propriétés toxicologiques, s'il existe des doutes fondés quant aux effets sur l'environnement. Dans la négative, l'évaluation des risques ne doit pas comprendre les travaux prévus à l'article 3, § 2, 3°, 1), a) et b), et l'on aboutit à la conclusion de l'article 3, § 2, 1°, 4), a).

4° Conclusions de l'évaluation des risques :

1) Après avoir effectué l'évaluation des risques conformément à l'article 3, § 2, 2° et 3°, et conformément aux annexes ERB I, ERB II et ERB III, il est déterminé, conformément à l'annexe ERB IV, quelle(s) est (sont), parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4), celles(s) qui s'impose(nt) et il est pris, si nécessaire, les mesures décrites à l'article 3, § 2, 1°, 5).

2) Lorsque des informations complémentaires ont été reçues en application de l'article 2, § 1^{er}, 2°, de l'article 2, § 2, 3° et 4°, de l'article 2, § 9, 1° ou de l'article 5 ou d'une autre façon, l'évaluation des risques, réalisée conformément à l'article 3, § 2, 2° et 3°, et aux annexes ERB I, ERB II et ERB III, doit être revue et, si nécessaire, révisée.

5° Contenu du rapport écrit destiné à la Commission européenne :

1) Après avoir évalué les risques conformément à l'article 3, § 2, 2° et 3°, et élaboré des conclusions conformément à l'article 3, § 2, 4°, il est préparé un rapport écrit contenant, au minimum, les informations prévues à l'annexe ERB V. Ce rapport est envoyé à la Commission européenne. Il est mis à jour après toute révision de l'évaluation effectuée à la lumière des informations complémentaires. La nouvelle version est, également, transmise à la Commission européenne.

2) Lorsque les autorités compétentes sont parvenues à un accord sur le rapport écrit concernant l'évaluation des risques ou sur une quelconque révision de l'évaluation, une copie de ce rapport est mise à la disposition du notifiant, à sa demande.

6° Les principes généraux régissant l'évaluation des risques sont repris dans les annexes ERB du présent arrêté.

Le Ministre peut adapter, en tout temps, les annexes ERB de cet arrêté aux nouvelles prescriptions de l'Union européenne.

§ 3. Indeling :

1° De stoffen worden op basis van hun intrinsieke eigenschappen ingedeeld in de in artikel 1, § 4, gedefinieerde categorieën. Bij de indeling van de stoffen wordt rekening gehouden met onzuiverheden voor zover hun concentraties de concentratiegrenzen overschrijden bedoeld in artikel 3, § 3, 4°, van dit besluit en in artikel 5 van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

2° De algemene beginselen voor de indeling en het kenmerken van de stoffen en preparaten worden toegepast volgens de criteria van bijlage VI, behoudens andersluidende bepalingen inzake gevaarlijke preparaten die in bijzondere besluiten worden vastgesteld.

3° Bijlage I bevat de lijst van stoffen die overeenkomstig de in artikel 3, § 3, beschreven beginselen zijn ingedeeld, alsmede de geharmoniseerde indeling en het kenmerken ervan.

4° De in bijlage I opgenomen gevaarlijke stoffen worden zo nodig gekarakteriseerd door concentratiegrenzen of een andere parameter met behulp waarvan het gezondheidsrisico of milieugevaar van de preparaten die voornoemde gevaarlijke stoffen bevatten, of de stoffen die voornoemde gevaarlijke stoffen als onzuiverheden bevatten, kan worden beoordeeld.

§ 4. Plicht tot onderzoek :

De fabrikanten van, handelaars in en importeurs van gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen, doch wel in EINECS, dienen een onderzoek in te stellen ten einde kennis te nemen van de bestaande relevante en toegankelijke gegevens betreffende de eigenschappen van die stoffen. Aan de hand van die gegevens moeten zij die stoffen verpakken en voorlopig kenmerken overeenkomstig de artikelen 7 en 8 en de criteria van bijlage VI.

Art. 4. Herhalingskennisgeving van een zelfde stof en voorkoming van herhaling van proeven met gewervelde dieren :

§ 1. Voor een stof waarvan reeds eerder overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, of artikel 2, § 2, 1°, kennisgeving is gedaan, mag de volgende kennisgever van die stof ten aanzien van de punten 3, 4, en 5, van de bijlagen VII A en VII B, en de punten 3 en 4, van bijlage VII C, verwijzen naar de resultaten van de door de oorspronkelijke kennisgever uitgevoerde proeven en onderzoeken voor zover de volgende kennisgever kan aantonen dat de stof waarvan opnieuw kennisgeving wordt gedaan, identiek is met die waarvan vroeger reeds kennisgeving is gedaan, onder andere wat de zuiverheidsgraad en de aard van de onzuiverheden betreft. Verwijzing naar de resultaten van de door de oorspronkelijke kennisgever verrichte proeven en onderzoeken kan slechts met diens schriftelijke toestemming geschieden.

§ 2. Alvorens aspirantkennisgevers met het oog op een kennisgeving overeenkomstig artikel 2, § 1, 1°, of artikel 2, § 2, 1°, tot experimenten met gewervelde dieren overgaan, dienen zij onverminderd artikel 4, § 1, van dit besluit bij de Minister de volgende inlichtingen in te winnen :

- a) of van de stof waarvan zij voornemens zijn kennisgeving te doen, reeds eerder kennisgeving is gedaan;
- b) de naam en het adres van de oorspronkelijke kennisgever.

Dit verzoek om inlichtingen moet worden gestaafd met gegevens waaruit blijkt dat de aspirant-kennisgever het voornemen heeft de stof op de markt te brengen, alsmede met gegevens betreffende de hoeveelheden die hij overweegt in de handel te brengen en het beoogde gebruik. Als bewijzen voor deze staving moeten zij verder de analytische en spectroscopische gegevens laten worden, het CAS-nummer zodra dit beschikbaar is, de structuur en brutoformule, stereochemische gegevens zo het optisch/geometrische isomeren betreft, de IUPAC-naam (naam volgens de nomenclatuur van de International Union of Pure and Applied Chemistry) of een beschrijving die moet toelaten vast te stellen of de stof moet worden beschouwd als een UVCB-product (stof van ongekende of variabele samenstelling, product als resultaat van een complexe reactie en biologische stof) alsook het EEG-nummer van de stof indien men vermoedt dat ze reeds in ELINCS voorkomt.

§ 3. Classification :

1° Les substances sont classées en fonction de leurs propriétés intrinsèques selon les catégories prévues à l'article 1^{er}, § 4. Dans la classification des substances, il est tenu compte des impuretés, pour autant que leurs concentrations dépassent des limites de concentration visées à l'article 3, § 3, 4°, du présent arrêté et à l'article 5 de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage, et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995.

2° Les principes généraux de classification et d'étiquetage des substances et préparations sont appliqués selon les critères prévus à l'annexe VI sauf prescriptions contraires relatives aux préparations dangereuses, prévues dans des arrêtés particuliers.

3° L'annexe I reproduit la liste des substances classées selon les principes fixés à l'article 3, § 3, avec leur classification harmonisée et leur étiquetage.

4° Les substances dangereuses énumérées à l'annexe I sont, le cas échéant, caractérisées par des limites de concentration ou un autre paramètre permettant l'évaluation du danger, pour la santé ou l'environnement, des préparations contenant les dites substances dangereuses ou des substances contenant d'autres substances dangereuses à titre d'impuretés.

§ 4. Obligation de recherche :

Les fabricants, distributeurs et importateurs de substances dangereuses ne figurant pas encore à l'annexe I mais énumérées dans l'EINECS, sont tenus d'effectuer une recherche afin de prendre connaissance des données pertinentes et accessibles existantes, concernant les propriétés de ces substances. Sur la base de ces informations, ils doivent emballer et provisoirement étiqueter ces substances conformément aux règles établies aux articles 7 et 8 et aux critères fixés à l'annexe VI.

Art. 4. Renotification d'une même substance et manière d'éviter la répétition des essais sur des vertébrés :

§ 1^{er}. Lorsqu'une substance a déjà été notifiée conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, ou à l'article 2, § 2, 1°, le notifiant ultérieur de cette substance peut, en ce qui concerne les points 3, 4 et 5, des annexes VII A et VII B, et les points 3 et 4, de l'annexe VII C, se référer aux résultats des essais et études transmis par le premier notifiant pour autant que le notifiant ultérieur puisse démontrer que la substance renotifiée est la même que celle notifiée précédemment, en ce sont compris le degré de pureté et la nature des impuretés. La référence à des résultats d'essais et d'études transmis par un premier notifiant est soumise, préalable-ment, à son accord écrit.

§ 2. Avant d'entreprendre des essais sur des vertébrés aux fins de soumettre une notification conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1°, ou à l'article 2, § 2, 1°, et sans préjudice de l'article 4, § 1^{er}, du présent arrêté, les notifiants potentiels doivent demander au Ministre :

- a) si oui ou non la substance qu'ils entendent notifier a déjà été notifiée;
- b) le nom et l'adresse du premier notifiant.

Cette demande d'informations est étayée par des pièces justificatives desquelles il ressort que le notifiant potentiel a l'intention de mettre la substance sur le marché en précisant les quantités qu'il projette de commercialiser ainsi que l'utilisation prévue. Comme preuve de cette justification, il incombe, aux notifiants, de communiquer les données analytiques et spectroscopiques, le numéro C.A.S., dès que celui-ci est disponible, la formule de structure et la formule brute, les données stéréochimiques dans la mesure où elles se rapportent aux isomères optiques/géométriques, le nom UICPA (nom suivant la nomenclature de l'Union internationale de Chimie pure et appliquée) ou dans le cas d'un produit UVCB (substance de composition inconnue ou variable, produit de réaction complexe et matière biologique), une description permettant de déterminer si la substance doit être considérée comme un produit UVCB ainsi que le numéro CEE de la substance si l'on présume que cette substance est déjà reprise dans la liste ELINCS.

Als de Minister (die het verzoek om inlichtingen ontvangt), overtuigd is van het voornemen van de aspirant-kennisgever om de stof in de opgegeven hoeveelheden op de markt te brengen, er van de stof reeds eerder kennisgeving is gedaan, en de oorspronkelijke kennisgever geen tijdelijke vrijstelling van de bepalingen van dit artikel heeft gevraagd en gekregen, deelt de Minister de aspirant-kennisgever naam en adres van de oorspronkelijke kennisgever mee en geeft hij tegelijkertijd aan de oorspronkelijke kennisgever naam en adres van de aspirant-kennisgever op.

De oorspronkelijke kennisgever en de aspirant-kennisgever doen al het nodige om overeenstemming te bereiken over de uitwisseling van informatie ten einde herhaling van proeven met gewervelde dieren te voorkomen.

§ 3. Kennisgevers van een zelfde stof die zijn overeengekomen gegevens met betrekking tot bijlage VII overeenkomstig artikel 4, §§ 1 en 2, uit te wisselen, doen tevens al het nodige om overeenstemming te bereiken over de uitwisseling van overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, ingediende informatie met betrekking tot proeven met gewervelde dieren.

Art. 5. § 1. Bij het Ministerie van Volksgezondheid en Leefmilieu wordt een Commissie gevaarlijke produkten opgericht, hierna de « Commissie » genoemd, samengesteld uit gewone leden :

1° twee technische ambtenaren van het Ministerie van Sociale Zaken, van Volksgezondheid en Leefmilieu;

2° twee leden van het wetenschappelijk personeel van het Instituut voor Hygiëne en Epidemiologie van het Ministerie van Sociale Zaken, van Volksgezondheid en Leefmilieu;

3° drie technische ambtenaren van het Ministerie van Tewerkstelling en Arbeid;

4° één technisch ambtenaar van het Ministerie van Middenstand en Landbouw;

5° één lid van het wetenschappelijk personeel van het Instituut voor Scheikundig Onderzoek van het Ministerie van Middenstand en Landbouw;

6° twee technische ambtenaren van het Ministerie van Economische Zaken;

7° twee ambtenaren van de Civiele Bescherming van het Ministerie van Binnenlandse Zaken.

De leden van de Commissie worden benoemd door de Minister. Voor de leden bedoeld onder 3°, 4°, 5°, 6° en 7°, van artikel 5, § 1, gebeurt de benoeming op de voordracht van de betrokken Ministers.

Voor ieder gewoon lid van de Commissie wordt onder dezelfde voorwaarden een plaatsvervanger aangesteld.

Daarenboven kan de Minister op voordracht van de Commissie, deze laatste aanvullen met tijdelijke raadgevers die op grond van hun kennis op het stuk van de gevaarlijke produkten worden gekozen. De raadgevers hebben geen beraadslagende stem.

Ook kan de Commissie in de loop van haar werkzaamheden de personen horen van wie het advies haar nuttig voorkomt. Desgevallend kan zij een beroep doen op deskundigen.

De adviezen worden aangenomen bij gewone meerderheid van stemmen van de aanwezige leden. Bij staking van stemmen is de stem van de voorzitter beslissend.

De Commissie stelt haar reglement van inwendige orde op dat aan de Minister ter goedkeuring wordt voorgelegd. Dat reglement kan, onder de voorwaarden welke het bepaalt, voorzien in de toekenning van presentiegeld, van vergoedingen, of in de terugbetaling van onkosten, aan de leden van de Commissie, aan de eventueel geraadpleegde deskundigen alsook aan de personeelsleden van het Bestuur van de Volksgezondheid.

Lorsque le Ministre (recevant la demande de renseignements) est convaincu que le notifiant potentiel a l'intention de mettre la substance sur le marché dans les quantités indiquées, que la substance a été notifiée précédemment et que le premier notifiant n'a ni demandé ni reçu de dérogation temporaire aux dispositions du présent article, le Ministre communique, au notifiant potentiel, le nom et l'adresse du premier notifiant et informe ce dernier des nom et adresse du notifiant potentiel.

Le premier notifiant et le notifiant potentiel prennent toutes les dispositions nécessaires pour arriver à un accord sur l'utilisation partagée des informations, de façon à éviter une répétition des essais sur vertébrés.

§ 3. Les notifiants d'une même substance qui sont arrivés à un accord sur l'utilisation partagée des informations relatives à l'annexe VII, conformément à l'article 4, §§ 1^{er} et 2, prennent aussi toutes les dispositions nécessaires pour arriver à un accord sur l'utilisation partagée des informations provenant des essais sur des vertébrés conformément à l'article 2, § 1^{er}, 2°.

Art. 5. § 1^{er}. Il est instauré, auprès du Ministère de la Santé publique et de l'Environnement, une Commission des Produits dangereux dénommée ci-après la « Commission » et composée de membres effectifs :

1° deux fonctionnaires techniques du Ministère des Affaires sociales, de la Santé publique et de l'Environnement;

2° deux membres du personnel scientifique de l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie du Ministère des Affaires sociales, de la Santé publique et de l'Environnement;

3° trois fonctionnaires techniques du Ministère de l'Emploi et du Travail;

4° un fonctionnaire technique du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture;

5° un membre du personnel scientifique de l'Institut de Recherches chimiques du Ministère des Classes moyennes et de l'Agriculture;

6° deux fonctionnaires techniques du Ministère des Affaires économiques;

7° deux fonctionnaires de la Protection civile du Ministère de l'Intérieur.

Les membres de la Commission sont nommés par le Ministre. Les membres visés aux points 3°, 4°, 5°, 6° et 7°, de l'article 5, § 1^{er}, sont nommés sur proposition des Ministres concernés.

Il est désigné, dans les mêmes conditions, un membre suppléant pour chaque membre de la Commission.

En outre, le Ministre peut, sur proposition de la Commission, adjoindre, à ceux-ci, des consultants temporaires choisis en raison de leurs connaissances en matière de produits dangereux. Les consultants n'ont pas de voix délibérative.

Lors de ses travaux, la Commission peut, également, entendre les personnes dont il semble utile de recueillir l'avis. Le cas échéant elle peut, également, faire appel à des experts.

Les avis de la Commission sont pris à la majorité simple des voix des membres présents. En cas de partage égal des voix, la voix du président est décisive.

La Commission établit son règlement d'ordre intérieur qui est soumis, pour approbation, au Ministre. Ce règlement peut, selon les conditions qu'il détermine, prévoir l'attribution de jetons de présence, d'indemnités ou le remboursement de frais aux membres de la Commission, et aux experts éventuellement consultés ainsi qu'au personnel de l'Administration de l'Hygiène publique.

De Minister benoemt een van de gewone leden van de Commissie tot voorzitter. Hetzelfde geldt voor de ondervoorzitter. In geval van afwezigheid of belet wordt de voorzitter vervangen door de ondervoorzitter. Voorzitter en ondervoorzitter behoren tot een verschillende taalrol.

Het secretariaat van de Commissie wordt verzekerd door ambtenaren die behoren tot de diensten van het Leefmilieu van de Bestuursafdeling van de Volksgezondheid.

§ 2. De bevoegdheden van de Commissie zijn van technische en raadgevende aard :

I. De Commissie heeft als opdracht :

1) de in artikel 2, 3 en 4, § 1, bedoelde gegevens van de kennisgever in ontvangst te nemen en te verifiëren of deze met de bepalingen van dit besluit in overeenstemming zijn;

2) het onderzoek van :

a) de door de kennisgever voorgestelde conclusies in verband met de te voorziene gevaren die de stof kan opleveren;

b) de voorstellen van de kennisgever betreffende het indelen en het kenmerken van de stof;

c) de voorstellen van aanbevelingen gedaan door de kennisgever inzake het veilig en hygiënisch gebruik van de stof met het oog op de bescherming van de gezondheid van de werknemer en van de bevolking;

d) de dossiers die door de Commissie van de Europese Unie aan de Minister worden toegestuurd.

3) Bij een conflict inzake het gebruik van beschikbare informatie tussen kennisgevers en aspirant-kennisgevers van dezelfde stof bemiddelt de Commissie via een confrontatie- en arbitrageprocedure rekening houdende met de in artikel 2, § 1, 1^o, A, e), bedoelde tijdelijke vrijstelling en het redelijke evenwicht tussen de belangen van de betrokken partijen. Indien ondanks artikel 4, §§ 2 en 3, geen overeenstemming wordt bereikt over het delen van gegevens, neemt de Minister, op advies van de Commissie, de maatregelen waarbij vroegere kennisgevers en aspirant-kennisgevers van dezelfde stof verplicht worden gegevens te delen om herhaling van proeven met gewervelde dieren te voorkomen.

De Commissie kan weigeren gegevens van nieuwe testen te beoordelen indien de Minister, op haar advies, geen toelating tot het uitvoeren van deze testen heeft gegeven.

4) Risico-evaluatie tot beoordeling van het feitelijke of potentiële risico van stoffen :

Voor de stoffen waarvan overeenkomstig artikel 2, § 1, 1^o, en artikel 2, § 2, 1^o en 2^o, kennis wordt gegeven, maakt de Commissie volgens de in artikel 3, § 2, 1^o, bedoelde algemene beginselen een beoordeling op van het feitelijke of potentiële risico. De beoordeling bevat aanbevelingen omtrent de meest geschikte testmethode voor de stof en eventueel ook aanbevelingen voor maatregelen waarmee de risico's van het op de markt brengen van de stof voor mens en milieu kunnen worden verminderd. De beoordeling wordt op gezette tijden bijgewerkt aan de hand van nadere informatie die ingevolge artikel 2, § 1, 2^o, artikel 2, § 2, 3^o, en artikel 4, § 1, is verstrekt.

II. Bovendien kan de Commissie, indien zulks noodzakelijk blijkt voor de beoordeling van het gevaar dat een stof kan opleveren, nadere inlichtingen, aanvullend onderzoek en verificatie- of controleproeven vragen met betrekking tot stoffen of de door verwerking daarvan verkregen producten, omtrent welke zij op grond van dit besluit een kennisgeving of informatie heeft ontvangen zoals :

1) de in bijlage VIII bedoelde inlichtingen eerder opvragen dan in artikel 2, § 1, 2^o, is bepaald;

2) het laten overgaan tot het nemen en ontleden van de nodige monsters voor controledoelinden;

Le Ministre nomme un membre effectif de la Commission comme président. Il en est de même pour le vice-président. En cas d'absence ou d'empêchement, le président est remplacé par le vice-président. Le président et le vice-président appartiennent à un rôle linguistique différent.

Le secrétariat de la Commission est assuré par des fonctionnaires des services de l'Environnement de l'Administration de l'Hygiène publique.

§ 2. Les attributions de la Commission sont de nature technique et consultative :

I. La Commission a pour mission :

1) de recevoir, du notifiant, les informations prévues à l'article 2, 3 et 4, § 1^{er}, et d'examiner leur conformité avec le présent arrêté;

2) l'examen :

a) des conclusions proposées par le notifiant en rapport avec les dangers prévisibles que la substance peut occasionner;

b) des propositions du notifiant concernant la classification et l'étiquetage de la substance;

c) des propositions de recommandation faites par le notifiant en ce qui concerne la sécurité d'emploi et l'hygiène d'utilisation de la substance dans le but de protéger la santé du travailleur et de la population;

d) des dossiers envoyés, par la Commission de l'Union européenne, au Ministre.

3) Lors d'un conflit concernant l'utilisation des informations disponibles entre notifiants et notifiants potentiels d'une même substance, la Commission servira de médiateur, par le biais d'une procédure de confrontation et d'arbitrage, en tenant compte de l'article 2, § 1^{er}, 1^o, A, e), de la dérogation temporaire et de l'équilibre raisonnable entre les intérêts des parties concernées. Si malgré l'article 4, §§ 2 et 3, un accord n'est pas acquis sur le partage des données, le Ministre, sur avis de la Commission, prend les mesures nécessaires par lesquelles les premiers notifiants et les candidats notifiants d'une même substance sont obligés de partager des données de manière à éviter la répétition d'essais sur vertébrés.

La Commission peut refuser d'évaluer les données relatives à des nouveaux essais si le Ministre, sur avis de celle-ci, n'en a pas autorisé la mise en oeuvre.

4) L'évaluation des risques aux fins de déterminer les risques réels ou potentiels des substances :

Pour les substances notifiées conformément à l'article 2, § 1^{er}, 1^o, et à l'article 2, § 2, 1^o et 2^o, la Commission établit, conformément à l'article 3, § 2, 1^o, les principes généraux d'évaluation des risques. L'évaluation comprend les recommandations concernant la méthode de test la plus appropriée et d'éventuelles recommandations pour des mesures visant à diminuer les risques, pour l'homme et l'environnement, liés à la mise sur le marché d'une substance. L'évaluation est mise à jour à intervalles réguliers à la lumière d'informations nouvelles qui sont communiquées conformément à l'article 2, § 1^{er}, 2^o, à l'article 2, § 2, 3^o, et à l'article 4, § 1^{er}.

II. Si cela est indispensable à l'évaluation du danger qu'une substance peut engendrer, la Commission peut, en outre, demander des informations complémentaires, des examens complémentaires et des analyses de contrôle ou de vérification concernant les substances ou les produits qui en sont dérivés, pour lesquelles elle a reçu une notification ou une information sur base du présent arrêté, notamment :

1) demander, plus rapidement, les informations de l'annexe VIII que ne le prévoit l'article 2, § 1^{er}, 2^o;

2) faire prélever et faire analyser les échantillons nécessaires à des fins de contrôle;

3) de kennisgever vragen om van de stof waarvan kennisgeving is gedaan die hoeveelheden te verstrekken die noodzakelijk zijn om de verificatieproeven te kunnen verrichten;

4) passende maatregelen aan de Minister voorstellen inzake veilig gebruik van een stof;

5) het advies inwinnen van de Hoge Gezondheidsraad.

§ 3. De Commissie richt, bij kennisgevingen overeenkomstig artikel 2, § 1, binnen de vijftig dagen en bij kennisgevingen overeenkomstig artikel 2, § 2, binnen de vijftig dagen na ontvangst van een kennisgevingsdossier een met redenen omkleed advies aan de Minister, met betrekking tot :

1° de volledigheid van het dossier zoals vereist door artikel 2, § 1, van dit besluit. (Zo kan o.m. gecontroleerd worden of van de stof reeds eerder kennisgeving is gedaan, of de aspirant-kennisgever duidelijk het voornemen heeft om de stof in de opgegeven hoeveelheden op de markt te brengen en de oorspronkelijke kennisgever geen tijdelijke vrijstelling van de bepalingen van artikel 4, § 2, heeft gevraagd en gekregen);

2° de elementen van het dossier die onder de geheimhouding vallen ingevolge artikel 6 van dit besluit, waarbij rekening wordt gehouden met de verzoeken en de motivering vanwege de kennisgever;

3° de conformiteit van de door de kennisgever verschaft inlichting met de bepalingen van dit besluit.

§ 4. Bij kennisgevingen overeenkomstig artikel 2, § 1, deelt de Minister binnen zestig dagen na ontvangst van de kennisgeving de kennisgever schriftelijk mee of de kennisgeving in overeenstemming met dit besluit is bevonden. Wanneer het dossier is aanvaard, deelt de Minister tegelijkertijd de kennisgever het officiële nummer mee dat aan zijn kennisgeving is toegekend.

Wanneer het dossier niet is aanvaard, deelt de Minister de kennisgever mee welke verdere informatie hij dient te verschaffen om het dossier in overeenstemming met dit besluit te brengen.

§ 5. Bij kennisgevingen overeenkomstig artikel 2, § 2, besluit de Minister binnen dertig dagen na ontvangst van de kennisgeving of deze in overeenstemming is met dit besluit en indien hij de kennisgeving niet in overeenstemming acht, deelt hij de kennisgever mee welke verdere informatie hij dient te verschaffen om het dossier in overeenstemming met dit besluit te brengen. Voldoet de kennisgeving daarentegen aan dit besluit, dan deelt de Minister de kennisgever binnen dezelfde termijn het officiële nummer mee dat aan zijn kennisgeving is toegekend.

§ 6. Voor stoffen die buiten de Europese Unie zijn vervaardigd en waarbij meer dan één kennisgeving is gedaan voor de door één fabrikant vervaardigde stof, is de bevoegde overheid, in overleg met de bevoegde instanties van de andere Lidstaten en met de Commissie van de Europese Unie verantwoordelijk voor de berekening van de jaarlijkse en cumulatieve tonnages die in de Europese Unie op de markt worden gebracht. Wanneer de in artikel 2, § 1, 2°, aangegeven tonnages worden bereikt, zal de bevoegde instantie die voor de ontvangst van de kennisgevingen verantwoordelijk is, met elke kennisgever contact opnemen ten einde hem op de hoogte te brengen van de identiteit van de andere kennisgevers en hem attent maken op hun in artikel 2, § 5, vermelde gezamenlijke verantwoordelijkheid.

§ 7. De Minister kan te allen tijde, na advies van de Commissie, voor dit besluit passende maatregelen nemen inzake veilig gebruik van een stof.

Art. 6. Vertrouwelijkheid van gegevens en industriële en commerciële geheimhouding :

§ 1. 1° Indien zich volgens de kennisgever problemen in verband met de vertrouwelijkheid van de gegevens voordoen, kan de kennisgever aangeven dat bepaalde in artikel 2, §§ 1 en 2, en artikel 2, § 9, bedoelde gegevens welke hij commercieel gevoelig acht en waarvan de verspreiding hem uit industrieel en commercieel oogpunt schade zou kunnen

3) demander, au notifiant, de fournir les quantités nécessaires de la substance notifiée pour pouvoir faire des essais de vérification;

4) proposer, au Ministre, les mesures adéquates relatives à la sécurité d'emploi d'une substance;

5) demander l'avis du Conseil supérieur d'Hygiène publique.

§ 3. Pour les notifications introduites conformément à l'article 2, § 1^{er}, la Commission adresse un avis motivé au Ministre endéans les cinquante-cinq jours de la réception. Pour celles introduites conformément à l'article 2, § 2, ce délai est ramené à vingt-cinq jours. La motivation de l'avis concerne les points suivants :

1° le caractère complet du dossier, comme requis par l'article 2, § 1^{er}, du présent arrêté. (Ainsi, il sera possible de contrôler, entre autres, si la substance a déjà été notifiée auparavant, si le notifiant potentiel a fermement l'intention de mettre la substance sur le marché dans les quantités annoncées et si le notifiant d'origine n'a pas demandé et reçu une dérogation temporaire aux exigences de l'article 4, § 2);

2° les éléments du dossier, couverts par la confidentialité conformément à l'article 6 du présent arrêté, en tenant compte des demandes et de la motivation du notifiant;

3° la conformité des renseignements, donnés par le notifiant, aux dispositions du présent arrêté.

§ 4. Pour les notifications conformes à l'article 2, § 1^{er}, le Ministre informe le notifiant, par courrier, endéans le délai de soixante jours de ce que la notification est conforme au présent arrêté. Lorsque le dossier est accepté, le Ministre communique, en même temps, au notifiant, le numéro officiel attribué à sa notification.

Quand le dossier n'est pas accepté, le Ministre informe le notifiant quant à l'(aux) information(s) complémentaire(s) qu'il doit encore fournir pour rendre le dossier de notification conforme au présent arrêté.

§ 5. Pour les notifications conformes à l'article 2, § 2, le Ministre décide, endéans les trente jours après réception de ladite notification, si elle est conforme au présent arrêté et s'il la considère comme non conforme, il informe le notifiant quant aux informations complémentaires qu'il doit encore fournir pour rendre le dossier de notification conforme au présent arrêté. Par contre, si la notification est conforme au présent arrêté, le Ministre informe le notifiant, endéans ce même délai, du numéro officiel qu'il a attribué à la notification.

§ 6. Pour les substances fabriquées en dehors de l'Union européenne et pour lesquelles plus d'une notification a été faite pour une substance produite par un seul fabricant, l'autorité compétente, en liaison avec les autorités compétentes des autres Etats membres et la Commission de l'Union européenne, est chargée de calculer les quantités annuelles cumulées mises sur le marché de l'Union européenne. Si les seuils fixés à l'article 2, § 1^{er}, 2°, sont atteints, l'autorité compétente, à laquelle sont adressées les notifications, prend contact avec chacun des notifiants et leur communique l'identité des autres notifiants en attirant l'attention sur la responsabilité collective des notifiants, telle que fixée à l'article 2, § 5.

§ 7. Dans le cadre du présent arrêté et sur avis de la Commission, le Ministre peut, en tout temps, prendre des mesures adéquates pour l'usage, en toute sécurité, d'une substance.

Art. 6. Confidentialité des données et secret industriel et commercial :

§ 1^{er}. 1° S'il est estimé qu'il existe un problème de confidentialité, le notifiant peut signaler les informations, prévues à l'article 2, §§ 1^{er} et 2, et à l'article 2, § 9, qu'il considère comme commercialement sensibles et dont la diffusion pourrait lui porter préjudice, en matière industrielle ou commerciale, pour lesquelles il revendique le secret vis à vis de toute

berokkenen, voor iedereen behalve de bevoegde instanties en de Commissie van de Europese Unie geheim moeten worden gehouden. Deze aanduiding moet met redenen worden omkleed.

2° Ten aanzien van de overeenkomstig artikel 2, § 1, 1° en 2°, en artikel 2, § 2, 1°, 2° en 3°, ingediende kennisgevingen en gegevens kan geen aanspraak op industriële en commerciële geheimhouding worden gemaakt voor :

- a) de handelsnaam van de stof;
- b) de naam van de fabrikant en de kennisgever;
- c) de fysisch-chemische gegevens inzake de stof, bedoeld in punt 3 van de bijlagen VII A, VII B, VII C en VII D;
- d) de mogelijkheden om de stof onschadelijk te maken;
- e) de beknopte resultaten van de toxicologische en ecotoxicologische proeven;
- f) indien absoluut noodzakelijk voor de indeling en het kenmerken van de stof met het oog op opname ervan in bijlage I, de zuiverheidsgraad van de stof en de identiteit van de onzuiverheden en/of additieven die gevaarlijk zijn in de zin van artikel 1, § 4;
- g) de aanbevolen methoden en voorzorgsmaatregelen, bedoeld in de bijlagen VII A, VII B, VII C en VII D, punt 2.3, en de noodmaatregelen, bedoeld in de bijlagen VII A, VII B, VII C en VII D, punten 2.4 en 2.5;
- h) de in het veiligheidsinformatieblad opgenomen gegevens;
- i) met betrekking tot de stoffen van bijlage I, de analysemethoden waardoor een gevaarlijke stof kan worden gevolgd nadat zij in het milieu is gebracht en waardoor de rechtstreekse blootstelling van de mens aan deze stof kan worden bepaald.

3° Indien de kennisgever, fabrikant of importeur aanvankelijk vertrouwelijke informatie later zelf openbaar maakt, moet hij de Minister daarvan schriftelijk op de hoogte stellen.

§ 2. De instantie die de kennisgeving of de informatie heeft ontvangen, besluit op eigen verantwoordelijkheid welke inlichtingen overeenkomstig artikel 6, § 1, onder de industriële en commerciële geheimhouding vallen.

Informatie die vertrouwelijk wordt geacht door de instantie die het kennisgevingsdossier van de kennisgever ontvangt, moet als zodanig worden behandeld door de andere bevoegde instanties en de Commissie van de Europese Unie.

§ 3. 1° Van een op de Elnclslijst van nieuwe stoffen voorkomende stof die niet in de zin van dit besluit als gevaarlijke stof is ingedeeld, mag op verzoek van de bevoegde instantie waaraan de kennisgeving is toegezonden als benaming, de handelsnaam worden opgegeven. Gewoonlijk wordt een dergelijke stof voor ten hoogste drie jaar onder haar handelsnaam in de lijst opgenomen. Indien de bevoegde instantie waarbij het dossier is ingediend, van mening is dat reeds door de publicatie van de chemische benaming in de nomenclatuur volgens de International Union of Pure and Applied Chemistry informatie over de commerciële exploitatie of de vervaardiging wordt onthuld, mag de stof gedurende een naar goeddunken van de bevoegde instantie te bepalen periode alleen onder de handelsnaam worden geregistreerd.

2° Gevaarlijke stoffen mogen, op verzoek van de bevoegde instantie waaraan de kennisgeving is toegezonden, alleen onder de handelsnaam in de lijst worden vermeld, totdat zij in bijlage I worden opgenomen.

§ 4. 1° De ter kennis van de Commissie van de Europese Unie of bevoegde instanties van Lid-Staten gebrachte vertrouwelijke gegevens worden geheim gehouden.

2° In ieder geval mogen deze gegevens slechts ter kennis worden gebracht van specifiek bevoegde instanties of van personen die rechtstreeks betrokken zijn bij administratieve of gerechtelijke procedures die sancties meebrengen en die worden ingeleid ten einde

personne autre que les autorités compétentes et la Commission de l'Union européenne. Des justifications devront, alors, être fournies.

2° Pour les notifications et les informations relevant de l'article 2, § 1^{er}, 1° et 2°, et de l'article 2, § 2, 1°, 2° et 3°, ne relèvent pas du secret industriel et commercial :

- a) le nom commercial de la substance;
- b) le nom du fabricant et du notifiant;
- c) les données physico-chimiques de la substance, en relation avec le point 3 des annexes VII A, VII B, VII C et VII D;
- d) les possibilités de rendre la substance inoffensive;
- e) le résumé des résultats des essais toxicologiques et écotoxicologiques;
- f) le degré de pureté de la substance et l'identité des impuretés et/ou additifs qui sont connus comme dangereux au sens de l'article 1^{er}, § 4, si ces éléments sont indispensables pour la classification et l'étiquetage et pour l'inscription de la substance à l'annexe I;
- g) les méthodes et précautions recommandées, indiquées à l'annexe VII A, VII B, VII C et VII D, point 2,3, et les mesures d'urgence, indiquées à l'annexe VII A, VII B, VII C et VII D, points 2,4 et 2,5;
- h) les informations figurant sur la fiche de données de sécurité;
- i) dans le cas des substances figurant à l'annexe I, les méthodes d'analyses permettant de suivre une substance dangereuse après son introduction dans l'environnement et de déterminer l'exposition directe de l'homme à cette substance.

3° Si, ultérieurement, le notifiant ou le fabricant ou l'importateur rend lui-même publiques des informations auparavant confidentielles, il est tenu d'en informer le Ministre par écrit.

§ 2. L'autorité qui a reçu la notification ou les informations décide, sous sa responsabilité, des informations qui relèvent du secret industriel et commercial conformément à l'article 6, § 1^{er}.

L'information, acceptée comme confidentielle, par l'autorité qui reçoit le dossier de notification, du notifiant, doit être traitée, comme telle, par les autres autorités compétentes et par la Commission de l'Union européenne.

§ 3. 1° Pour les substances figurant sur la liste ELINCS des substances nouvelles et non classées comme dangereuses, au sens du présent arrêté, la dénomination peut se faire sous la forme du nom commercial dans les cas où l'autorité compétente à laquelle la notification a été soumise le requiert. Normalement, de telles substances peuvent être incluses, dans la liste, sous leur nom commercial, pour une durée maximale de trois ans. Cependant, si l'autorité compétente à laquelle le dossier a été soumis considère que la publication du nom chimique lui-même, selon la nomenclature de l'Union internationale de Chimie pure et appliquée, pourrait révéler des informations concernant l'exploitation commerciale ou la fabrication, la dénomination de la substance peut être enregistrée sous sa seule appellation commerciale, pour la durée que cette autorité compétente le juge opportune.

2° A la demande de l'autorité compétente qui reçoit la notification, les substances dangereuses peuvent être introduites, dans la liste, sous leur seule appellation commerciale, jusqu'à leur introduction dans l'annexe I.

§ 4. 1° Les informations confidentielles, portées à la connaissance de la Commission de l'Union européenne ou des autorités compétentes d'un Etat membre, sont tenues secrètes.

2° Dans tous les cas, ces informations ne peuvent être portées qu'à la connaissance des autorités dont les compétences sont spécifiées et peuvent, toutefois, être divulguées à des personnes directement

controle uit te oefenen op de op de markt gebrachte stoffen en mogen zij tevens worden verstrekt aan personen die moeten deelnemen of worden gehoord in het kader van een wetgevingsprocedure.

§ 5. Eenieder die deelneemt of die geroepen is tot deelname aan de werkzaamheden van de Commissie is absolute geheimhouding verschuldigd nopens alle vertrouwelijke inlichtingen of documenten waarvan hij of zij kennis heeft in de loop of ter gelegenheid van die werkzaamheden.

Art. 7. Verpakking.

§ 1. Gevaarlijke stoffen mogen slechts op de markt worden gebracht indien hun verpakking voldoet aan de volgende eisen :

a) de verpakking moet zodanig zijn ontworpen en uitgevoerd dat ongewild verlies van de inhoud wordt voorkomen. Dit geldt niet indien bijzondere veiligheidsvoorzieningen zijn voorgeschreven;

b) het materiaal van de verpakking en sluiting mag niet door de inhoud kunnen worden aangetast of daarmee een gevaarlijke verbinding kunnen vormen;

c) verpakking en sluiting moeten in alle onderdelen zo stevig en sterk zijn dat zij niet losraken en afdoende tegen elke normale behandeling bestand zijn;

d) recipiënten die voorzien zijn van een sluiting die meermaals kan worden gebruikt, moeten zodanig ontworpen zijn dat de verpakking herhaalde malen opnieuw gesloten kan worden zonder dat hierbij ongewild iets van de inhoud ontsnapt;

e) elk recipiënt, ongeacht de inhoud, die stoffen bevat die worden verkocht aan het grote publiek of daaraan ter beschikking worden gesteld, en waarvan het etiket de vermelding « zeer vergiftig », « vergiftig » of « bijtend » draagt, in de zin van dit besluit, moet voorzien zijn van een kinderveiligheidsluiting en van een bij aanraking waarneembare waarschuwing;

f) op elke recipiënt, ongeacht de inhoud, die stoffen bevat die worden verkocht aan het grote publiek of daaraan ter beschikking worden gesteld, en waarvan het etiket de vermelding « schadelijk », « zeer licht ontvlambaar » of « licht ontvlambaar » draagt, in de zin van dit besluit, moet een bij aanraking waarneembare waarschuwing worden aangebracht.

§ 2. De Minister kan bepalen dat verpakkingen bij de eerste vulling gesloten moeten worden met een zegel dat onherstelbaar wordt beschadigd wanneer de verpakking voor het eerst wordt geopend.

§ 3. De technische specificaties betreffende de in artikel 7, § 1, onder e) en f), genoemde voorzieningen worden vermeld in bijlage IX A en IX B bij dit besluit.

Art. 8. § 1. Kenmerken.

1° Gevaarlijke stoffen mogen alleen op de markt worden gebracht indien hun verpakking, wat het kenmerken betreft, voldoet aan de volgende voorschriften. Elke verpakking moet duidelijk leesbaar en onuitwisbaar de volgende aanduidingen bevatten :

a) benaming van de stof en wel een van de benamingen die in bijlage I voorkomen. Is de stof niet in bijlage I genoemd, dan moet de naam worden vermeld met gebruikmaking van een internationaal erkende nomenclatuur;

b) naam en volledig adres, inclusief telefoonnummer, van degene die verantwoordelijk is voor het op de markt brengen van de stof en gevestigd is in de Europese Unie, ongeacht of het de fabrikant, de importeur of de handelaar betreft;

c) gevarensymbolen, voor zover die bestaan, en aanduidingen van de aan het gebruik van de stof verbonden gevaren. De gevarensymbolen en de waarschuwingen dienen overeen te stemmen met bijlage II. De symbolen moeten in zwart op een oranjegele achtergrond worden

concernées par des procédures administratives ou judiciaires, impliquant des sanctions, entreprises dans le but de contrôler les substances mises sur le marché, ainsi qu'aux personnes qui doivent participer ou être entendues dans le cadre d'une procédure législative.

§ 5. Toute personne participant ou appelée à participer aux travaux de la Commission est tenue d'observer la discrétion la plus absolue sur tout renseignement ou document dont elle aurait eu connaissance au cours ou à l'occasion de ces travaux.

Art. 7. Emballage.

§ 1^{er}. Les substances dangereuses ne pourront être mises sur le marché que si leurs emballages répondent aux conditions suivantes :

a) les emballages doivent être conçus et réalisés de manière à empêcher toute déperdition du contenu. Cette disposition n'est pas applicable lorsque des dispositifs de sécurité spéciaux sont prescrits;

b) les matériaux, dont sont constitués les emballages et les fermetures, ne doivent pas être susceptibles d'être attaqués par le contenu, ni de former, avec ce dernier, des composés dangereux;

c) toutes les parties des emballages et des fermetures doivent être solides et résistantes de manière à exclure toute rupture et à répondre, en toute sécurité, aux exigences normales de manutention;

d) les récipients, disposant d'un système de fermeture pouvant être remis en place, doivent être conçus de manière que l'emballage puisse être refermé à plusieurs reprises sans déperdition du contenu;

e) tout récipient, quelle que soit sa capacité, qui contient des substances vendues au grand public ou mises à sa disposition et étiqueté « très toxique », « toxique » ou « corrosif », au sens du présent arrêté, doit être muni d'une fermeture de sécurité pour les enfants et porter une indication de danger décelable au toucher;

f) tout récipient, quelle que soit sa capacité, qui contient des substances vendues au grand public ou mises à sa disposition et étiqueté « nocif », « extrêmement inflammable » ou « facilement inflammable », au sens du présent arrêté, doit porter une indication de danger décelable au toucher.

§ 2. Le Ministre peut imposer que les emballages soient fermés, à l'origine, par un scellé de telle manière que celui-ci soit irrémédiablement détruit lorsque l'emballage est ouvert pour la première fois.

§ 3. Les spécifications techniques relatives aux dispositifs visés à l'article 7, § 1^{er}, e) et f), figurent à l'annexe IX, parties A et B du présent arrêté.

Art. 8. § 1^{er}. Etiquetage.

1° Les substances dangereuses ne peuvent être mises sur le marché que si l'étiquetage, sur leur emballage, répond aux conditions suivantes. Tout emballage doit porter de manière lisible et indélébile, les indications suivantes :

a) le nom de la substance, sous une des dénominations qui figurent à l'annexe I. Si la substance ne figure pas à l'annexe I, le nom doit être donné en utilisant une nomenclature internationalement reconnue;

b) le nom et l'adresse complète, y compris le numéro de téléphone, du responsable de la mise sur le marché de la substance, établi à l'intérieur de l'Union européenne, qu'il soit le fabricant, l'importateur ou le distributeur;

c) les symboles de danger, le cas échéant, et l'indication des dangers que présente l'emploi de la substance. Les symboles et les indications de danger doivent être conformes à l'annexe II. Les symboles sont imprimés en noir sur fond orangé-jaune. Les symboles et indications de

gedrukt. De voor iedere stof te gebruiken gevarensymbolen en waarschuwingen worden vermeld in bijlage I. Aan de gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen, worden gevarensymbolen en waarschuwingen toegewezen volgens de regels van bijlage VI.

Indien aan een stof meer dan één symbool is toegewezen :

— maakt de verplichting symbool T aan te brengen het aanbrengen van de symbolen X en C facultatief, behoudens andersluidende bepalingen in bijlage I;

— maakt de verplichting symbool C aan te brengen het aanbrengen van symbool X facultatief;

— maakt de verplichting symbool E aan te brengen het aanbrengen van de symbolen F en O facultatief;

d) de standaardvermeldingen waarin de bijzondere risico's verbonden aan het gebruik van de stof voorkomen (R-zinnen). Deze R-zinnen moeten worden opgesteld overeenkomstig de gegevens van bijlage III. De voor elke stof te gebruiken R-zinnen staan in bijlage I. In het geval van gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen, worden de te gebruiken R-zinnen toegekend volgens de regels van bijlage VI;

e) de standaardvermeldingen waarin de veiligheidsaanbevelingen voor het gebruik van de stof voorkomen (S-zinnen). Deze S-zinnen moeten worden opgesteld overeenkomstig de gegevens van bijlage IV. De voor elke stof te gebruiken S-zinnen staan in bijlage I. Voor gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen, worden de te gebruiken S-zinnen toegekend volgens de regels van bijlage VI;

f) het EEG-nummer, wanneer het wordt toegekend. Het EEG-nummer wordt verkregen op basis van de lijst van bestaande (EINECS) en van nieuwe (ELINCS) stoffen. Voor de stoffen in bijlage I staat op het etiket bovendien de vermelding « EEG-etikettering ».

2° Voor irriterende, licht ontvlambare, ontvlambare of oxyderende stoffen behoeven de R-en S-zinnen niet te worden vermeld indien de inhoud van de verpakking niet meer dan 125 milliliter bedraagt. Dit geldt eveneens voor de schadelijke stoffen, bij dezelfde inhoud, die niet in de detailhandel aan het publiek worden verkocht.

3° Vermeldingen als « niet vergiftig », « niet-schadelijk » of andere analoge vermeldingen mogen niet voorkomen op het etiket of de verpakking van de stoffen waarvoor dit besluit geldt.

§ 2. Tenuitvoerlegging van de voorschriften voor het kenmerken.

1° Indien de in artikel 8, § 1, voorgeschreven zinnen op een etiket worden aangebracht, dient dit stevig op een of meer zijden van de verpakking te worden gehecht zodat deze zinnen horizontaal kunnen worden gelezen wanneer de verpakking op de gebruikelijke wijze wordt neergezet. Voor de afmetingen van dit etiket gelden de onderstaande formaten :

Inhoud van de verpakking —	Formaat (in mm) indien mogelijk —
— ten hoogste 3 liter	ten minste 52 x 74
— meer dan 3 liter tot ten hoogste 50 liter	ten minste 74 x 105
— meer dan 50 liter tot ten hoogste 500 liter	ten minste 105 x 148
— meer dan 500 liter	ten minste 148 x 210

danger, à utiliser pour chaque substance, sont indiqués à l'annexe I. Pour les substances dangereuses qui ne sont pas encore reprises à l'annexe I, les symboles et indications de danger sont attribués selon les règles de l'annexe VI.

Si plus d'un symbole est attribué à une substance :

— l'obligation d'apposer le symbole T rend facultatif l'usage des symboles X et C, sauf dispositions contraires de l'annexe I;

— l'obligation d'apposer le symbole C rend facultatif l'usage du symbole X;

— l'obligation d'apposer le symbole E rend facultatif l'usage des symboles F et O;

d) les phrases types indiquant les risques particuliers dérivant des dangers d'utilisation, de la substance (phrases R). Ces phrases R doivent être libellées conformément aux indications de l'annexe III. Les phrases R, à utiliser pour chaque substance, sont indiquées à l'annexe I. Dans le cas de substances dangereuses qui ne figurent pas encore à l'annexe I, les phrases R, à utiliser, sont attribuées selon les règles établies à l'annexe VI;

e) les phrases types indiquant les conseils de prudence concernant l'emploi de la substance (phrases S). Ces phrases S doivent être libellées conformément aux indications de l'annexe IV. Les phrases S, à utiliser pour chaque substance, sont indiquées à l'annexe I. Dans le cas de substances dangereuses qui ne figurent pas encore à l'annexe I, les phrases S, à utiliser, sont attribuées selon les règles établies à l'annexe VI;

f) le numéro CEE lorsqu'il est attribué. Le numéro CEE est obtenu à partir de la liste des substances existantes (EINECS) et des substances nouvelles (ELINCS). Pour les substances figurant à l'annexe I, l'étiquette porte, aussi, la mention « Etiquetage CEE ».

2° Pour les substances irritantes, facilement inflammables, inflammables ou comburantes, il n'est pas nécessaire de rappeler les phrases R et les phrases S si le contenu de l'emballage ne dépasse pas 125 millilitres. Il en est de même pour les substances nocives, pour un même volume, si elles ne sont pas vendues, au détail, au grand public.

3° Les indications telles que « non toxique », « non nocif » ou toute autre indication analogue, ne peuvent pas figurer sur l'étiquette ou sur l'emballage des substances relevant du présent arrêté.

§ 2. Mise en oeuvre des conditions d'étiquetage.

1° Lorsque les mentions imposées par l'article 8, § 1^{er}, se trouvent sur une étiquette, celle-ci doit être fixée solidement sur une ou plusieurs faces de l'emballage, de façon que ces mentions puissent être lues horizontalement lorsque l'emballage est déposé de façon normale. Les dimensions de l'étiquette doivent correspondre aux formats suivants :

Capacité de l'emballage —	Format (en mm) si possible —
— inférieure ou égale à 3 litres	au moins 52 x 74
— supérieure à 3 litres et inférieure ou égale à 50 litres	au moins 74 x 105
— supérieure à 50 litres et inférieure ou égale à 500 litres	au moins 105 x 148
— supérieure à 500 litres	au moins 148 x 210

Ieder symbool beslaat ten minste een tiende van de oppervlakte van het etiket en het mag niet kleiner zijn dan 1 vierkante centimeter. Het etiket dient over de gehele oppervlakte te zijn gehecht aan de verpakking die de stof rechtstreeks bevat.

Deze formaten zijn uitsluitend bestemd voor het aanbrengen van de uit hoofde van dit besluit vereiste gegevens en eventueel van aanvullende gezondheids- of veiligheidsaanwijzingen.

2° Een etiket is niet vereist indien de aanduidingen op de in artikel 8, § 2, 4°, bepaalde wijze op duidelijke wijze op de verpakking zelf zijn aangebracht.

3° Kleur en uiterlijk van het etiket of, in het onder artikel 8, § 2, 2°, bedoelde geval, van de verpakking moeten zodanig zijn dat het gevarensymbool duidelijk tegen zijn achtergrond afsteekt.

4° De overeenkomstig artikel 8, § 1, op het etiket vereiste gegevens steken af tegen de achtergrond en hebben een dusdanige grootte en spatiering dat zij gemakkelijk leesbaar zijn.

De specifieke bepalingen betreffende de presentatie en het formaat van deze gegevens worden vastgesteld in bijlage VI.

5° De vermeldingen betreffende gevaarlijke stoffen worden gesteld in de taal of de talen van het taalgebied waar met deze stoffen wordt omgegaan.

6° Aan de bepalingen voor het kenmerken wordt in het kader van dit besluit geacht te zijn voldaan :

a) in het geval van een buitenverpakking die een of meer binnenverpakkingen omsluit, indien op de buitenverpakking de kenmerken overeenkomstig de internationale voorschriften voor het vervoer van gevaarlijke stoffen en op de binnenverpakking, respectievelijk binnenverpakkingen, de kenmerken overeenkomstig dit besluit zijn aangebracht;

b) in het geval van een enkelvoudige verpakking :

— indien op deze verpakking de kenmerken zijn aangebracht overeenkomstig de internationale voorschriften voor het vervoer van gevaarlijke stoffen en tevens overeenkomstig artikel 8, § 1, 1°, a), b), d), e) en f),

en,

— waar nodig, voor bijzondere verpakkingen, zoals bij voorbeeld mobiele gasflessen, kenmerken zijn aangebracht overeenkomstig de in bijlage VI bedoelde bijzondere voorschriften.

§ 3. Vrijstelling van de bepalingen voor het kenmerken en verpakking.

1° Artikel 7 en 8, §§ 1 en 2, zijn niet van toepassing op de bepalingen betreffende munitie en springstoffen die op de markt worden gebracht om door explosie of door een pyrotechnisch effect een nuttige uitwerking te hebben.

Bovendien zijn deze artikelen tot 30 april 1997 niet van toepassing op de bepalingen betreffende butaan, propaan en vloeibaar petroleumgas.

2° a) Het kenmerken zoals voorgeschreven in artikel 8, § 1, mag op een andere passende wijze geschieden indien de beperkte afmetingen of anderszins ongeschikte aard van de verpakking het kenmerken overeenkomstig artikel 8, § 2, 1° en 2°, onmogelijk maken;

b) in afwijking van artikel 8, §§ 1 en 2, mogen de verpakkingen van gevaarlijke stoffen, die niet ontplofbaar zijn, niet zeer vergiftig of niet vergiftig zijn, niet of op een andere wijze worden gekenmerkt, indien zij zulke geringe hoeveelheden bevatten dat er voor de personen die met deze stoffen omgaan of derden geen gevaar valt te duchten;

c) in afwijking van artikel 8, §§ 1 en 2, mogen de verpakkingen van ontplofbare, zeer vergiftige of vergiftige stoffen op een andere passende wijze worden gekenmerkt, wanneer door de beperkte afmetingen het kenmerken overeenkomstig genoemde bepalingen niet mogelijk is en er voor de personen die met deze stoffen omgaan en derden geen gevaar valt te duchten.

Op grond van deze afwijking, bedoeld in het geheel van dit punt 2°, mag geen gebruik worden gemaakt van andere symbolen, gevaaraanduidingen, R- of S-zinnen dan die welke bij dit besluit zijn vastgesteld.

Chaque symbole doit occuper au moins un dixième de la surface de l'étiquette sans toutefois être inférieure à 1 centimètre carré. L'étiquette doit adhérer, par toute sa surface, à l'emballage contenant directement la substance.

Ces formats sont destinés exclusivement à permettre l'inscription des informations exigées par le présent arrêté et éventuellement des indications complémentaires d'hygiène ou de sécurité.

2° Une étiquette n'est pas exigée lorsque l'emballage, lui-même, porte de façon apparente, les mentions requises selon les modalités prévues à l'article 8, § 2, 4°.

3° La couleur et la présentation de l'étiquette ou, dans le cas de l'article 8, § 2, 2°, de l'emballage, doivent être telles que le symbole de danger ressorte clairement sur le fond.

4° Les informations requises sur l'étiquette conformément à l'article 8, § 1^{er}, seront d'une taille suffisante et présenteront un espacement suffisant pour être aisément lisibles.

Les dispositions spécifiques concernant la présentation et le format de ces informations seront établies selon l'annexe VI.

5° Les indications d'étiquetage concernant les substances dangereuses sont établies dans la ou les langues de la région où ces substances sont manipulées.

6° Les exigences d'étiquetage du présent arrêté sont considérées comme étant remplies :

a) dans le cas d'un emballage extérieur renfermant un ou plusieurs emballages intérieurs, si l'emballage extérieur comporte un étiquetage conforme aux règlements internationaux en matière de transport de substances dangereuses et si le ou les emballages intérieurs sont pourvus d'un étiquetage conforme au présent arrêté;

b) dans le cas d'un emballage unique :

— si ce dernier comporte un étiquetage conforme aux règlements internationaux en matière de transport des substances dangereuses ainsi qu'à l'article 8, § 1^{er}, 1°, a), b), d), e) et f),

et,

— si nécessaire, pour des types particuliers d'emballage, comme, par exemple, les bonbonnes mobiles de gaz, conforme aux prescriptions spécifiques visées à l'annexe VI.

§ 3. Exemptions aux conditions d'étiquetage et d'emballage.

1° Les articles 7 et 8, §§ 1^{er} et 2, ne sont pas applicables aux dispositions relatives aux munitions et aux explosifs, mis sur le marché en vue de produire un effet pratique par explosion ou par effet pyrotechnique.

Les articles précités, ne sont, en outre, pas applicables aux dispositions relatives au butane, au propane et au gaz de pétrole liquéfié, jusqu'à la date du 30 avril 1997.

2° a) lorsque les emballages ont des dimensions restreintes ou sont autrement inadaptés à un étiquetage conforme à l'étiquetage imposé par l'article 8, § 2, 1° et 2°, l'étiquetage prévu à l'article 8, § 1^{er}, peut être effectué d'une autre façon appropriée;

b) par dérogation à l'article 8, §§ 1^{er} et 2, les emballages des substances dangereuses qui ne sont ni explosibles, ni très toxiques, ni toxiques, peuvent ne pas être étiquetés ou être étiquetés d'une autre façon s'ils contiennent des quantités tellement limitées qu'il n'y a pas lieu de craindre un danger pour les personnes manipulant ces substances ou pour les tiers;

c) lorsque les dimensions restreintes ne permettent pas l'étiquetage prévu aux articles 8, §§ 1^{er} et 2, et qu'il n'y a pas lieu de craindre un danger pour les personnes manipulant ces substances ou pour les tiers, les emballages des substances explosibles, très toxiques ou toxiques peuvent être étiquetés d'une autre façon appropriée.

Cette dérogation, visée à ce point 2° considéré dans son entièreté, ne permet pas l'utilisation de symboles, d'indications de danger, de phrases R ou de phrases S différents de ceux établis par le présent arrêté.

Art. 9. § 1. Elke vorm van reclame voor een stof behorende tot een of meer van de in artikel 1, § 4, bedoelde categorieën is verboden indien de betrokken categorie/categorieën niet is/zijn aangeduid.

§ 2. Veiligheidsinformatiebladen. Om met name de professionele gebruikers in staat te stellen de nodige maatregelen te nemen voor de bescherming van het milieu, alsmede van de gezondheid en de veiligheid op de werkplaats, verstrekt elke fabrikant, importeur of handelaar vóór de eerste levering van een gevaarlijke stof de afnemer, een veiligheidsinformatieblad. Dit informatieblad moet de nodige informatie voor de bescherming van mens en milieu bevatten. Vermeldingen betreffende de gevaren worden minstens gesteld in de taal of de talen van het gebied waar deze stoffen op de markt worden gebracht.

Het blad mag schriftelijk of elektronisch worden verstrekt. Daarna moet de fabrikant, de betrokken importeur of handelaar de ontvanger van het veiligheidsinformatieblad op de hoogte brengen van alle nieuwe relevante informatie betreffende de stof waarvan hij kennis heeft gekregen.

Dit informatieblad is samengesteld overeenkomstig de bepalingen van bijlage X bij dit besluit.

Vóór de eerste levering van een gevaarlijke stof in België, stuurt elke fabrikant, importeur of handelaar een kopie van het bovenbedoelde veiligheidsinformatieblad naar het Nationaal Centrum ter voorkoming en behandeling van intoxicaties bedoeld in het koninklijk besluit van 25 november 1983 betreffende Rijkstegemoetkoming aan het Nationaal Centrum ter voorkoming en behandeling van intoxicaties.

§ 3. Indien er in het licht van nieuwe gegevens, gegronde redenen bestaan om aan te nemen dat een stof die weliswaar aan de bepalingen van dit besluit voldoet, toch gevaar oplevert voor mens of milieu, omdat indeling, verpakking of etikettering niet meer adequaat zijn, kan de Minister deze stof tijdelijk herindelen of, zo nodig, het op de markt brengen daarvan tijdelijk verbieden of aan bijzondere voorwaarden onderwerpen. Hij brengt de Commissie van de Europese Unie en de andere Lidstaten onmiddellijk op de hoogte, onder aanvoering van de redenen voor zijn besluit.

Art. 2. § 1. De bijlagen van het koninklijk besluit van 24 mei 1982 houdende reglementering van het in de handel brengen van stoffen die gevaarlijk kunnen zijn voor de mens of voor zijn leefmilieu, gewijzigd bij de koninklijke besluiten van 14 februari 1985, 14 september 1989 en 19 juli 1994 worden als volgt gewijzigd :

- Bijlage I wordt vervangen door bijlage I bij dit besluit;
- Bijlage II wordt vervangen door bijlage II bij dit besluit;
- Bijlage III wordt vervangen door bijlage III bij dit besluit;
- Bijlage IV wordt vervangen door bijlage IV bij dit besluit;
- Bijlage V wordt gewijzigd als volgt :

De delen A, B en C die zijn ingevoerd door het koninklijk besluit van 14 februari 1985, worden vervangen door bijlage V bij dit besluit;

in het deel C, dat aan bijlage V werd toegevoegd door het KB van 14 september 1989, wordt de « Remmingstest voor algen » geschrapt.

- Bijlage VI wordt gewijzigd als volgt :

De delen I en II worden vervangen door bijlage VI bij dit besluit.

- Bijlage VII wordt vervangen door :

— bijlage VII A, gegevens die in het in artikel 2, § 1, bedoelde technisch dossier (basisdossier) moeten worden opgenomen;

— bijlage VII B, gegevens die in het in artikel 2, § 2, 1° en 3°, bedoelde technisch dossier (basisdossier) moeten worden opgenomen;

— bijlage VII C, gegevens die in artikel 2, § 2, 2°, bedoelde technisch dossier (basisdossier) moeten worden opgenomen;

Art. 9. § 1^{er}. Toute publicité pour une substance appartenant à une ou plusieurs des catégories visées à l'article 1^{er}, § 4, est interdite s'il n'y est pas fait mention de la ou des catégories concernées.

§ 2. Fiches de données de sécurité. Afin de permettre, notamment, aux utilisateurs professionnels de prendre les mesures nécessaires pour la protection de l'environnement ainsi que de la santé et de la sécurité sur les lieux de travail, avant la première livraison d'une substance dangereuse, tout fabricant, importateur ou distributeur adresse au destinataire une fiche de données de sécurité. Cette fiche doit comporter les renseignements nécessaires à la protection de l'homme et de l'environnement. Les mentions relatives aux dangers doivent être libellées, au moins, dans la ou les langues de la région où ces substances sont mises sur le marché.

Elle peut être communiquée sur papier ou électroniquement. Ultérieurement, le fabricant, l'importateur concerné ou le distributeur est tenu d'informer le destinataire de la fiche de données de sécurité de toute nouvelle information pertinente, concernant la substance, dont il a eu connaissance.

Cette fiche est élaborée conformément aux dispositions de l'annexe X du présent arrêté.

Avant la première livraison d'une substance dangereuse, en Belgique, tout fabricant, importateur ou distributeur adresse un exemplaire de la fiche de données de sécurité, susvisée, au Centre national de prévention et de traitement des intoxications visé à l'arrêté royal du 25 novembre 1983 relatif à l'intervention de l'Etat au Centre national de prévention et de traitement des intoxications.

§ 3. Si, compte tenu d'informations nouvelles, il existe des raisons valables d'estimer qu'une substance, bien que conforme aux prescriptions du présent arrêté, présente, néanmoins, un danger pour l'homme ou pour l'environnement du fait que sa classification, son emballage ou son étiquetage ne sont plus adéquats, le Ministre peut, provisoirement, reclassifier cette substance ou, au besoin, l'interdire ou la soumettre à des conditions particulières de mise sur le marché. Il en informe immédiatement la Commission de l'Union européenne et les autres Etats membres, en précisant les motifs de sa décision.

Art. 2. § 1^{er}. Les annexes de l'arrêté royal du 24 mai 1982 réglementant la mise sur le marché de substances pouvant être dangereuses pour l'homme ou son environnement, modifié par les arrêtés royaux des 14 février 1985, 14 septembre 1989 et 19 juillet 1994, sont modifiées comme suit :

- L'annexe I est remplacée par l'annexe I de cet arrêté;
- L'annexe II est remplacée par l'annexe II de cet arrêté;
- L'annexe III est remplacée par l'annexe III de cet arrêté;
- L'annexe IV est remplacée par l'annexe IV de cet arrêté;
- L'annexe V est modifiée comme suit :

Les parties A, B et C, introduites par l'arrêté royal du 14 février 1985, sont remplacées par L'annexe V du présent arrêté;

dans la partie C, ajoutée à l'annexe V par l'arrêté royal du 14 septembre 1989, la méthode « Essai d'inhibition de la croissance des algues » est supprimée.

- L'annexe VI est modifiée comme suit :

Les parties I et II sont remplacées par l'annexe VI de cet arrêté.

- L'annexe VII est remplacée par :

— l'annexe VII A, caractéristiques faisant l'objet du dossier technique (dossier de base) visé à l'article 2, § 1^{er};

— l'annexe VII B, caractéristiques faisant l'objet du dossier technique (dossier de base) visé à l'article 2, § 2, 1° et 3°;

— l'annexe VII C, caractéristiques faisant l'objet du dossier technique (dossier de base) visé à l'article 2, § 2, 2°;

— bijlage VII D, specifieke bepalingen betreffende het technische dossier (basisdossier) dat is opgenomen in de in artikel 2, § 6, bedoelde kennisgevingen betreffende polymeren.

— Bijlage VIII wordt vervangen door bijlage VIII, overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, vereiste aanvullende gegevens en onderzoeken.

— Bijlage IX wordt vervangen door bijlage IX bij dit besluit en omvat :

— deel A, bepalingen betreffende kinderveilige sluitingen;

— deel B, bepalingen betreffende bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen.

Een bijlage X, richtsnoeren voor de samenstelling van de kaarten met de gegevens omtrent de veiligheid wordt in bijlage bij dit besluit gevoegd.

§ 2. Voor de risicobeoordeling van stoffen worden volgende bij dit besluit gevoegde bijlagen als bijlagen bij het koninklijk besluit van 24 mei 1982 toegevoegd :

— Bijlage ERB I, risicobeoordeling : gezondheid (toxiciteit);

— Bijlage ERB II, risicobeoordeling : gezondheid (fysisch-chemische eigenschappen);

— Bijlage ERB III, risicobeoordeling : milieu;

— Bijlage ERB IV, algemene synthese van de conclusies;

— Bijlage ERB V, in het samenvattend rapport over de risicobeoordeling op te nemen gegevens.

§ 3. Indien nodig kunnen de Minister van Volksgezondheid, de Minister van Tewerkstelling en Arbeid en de Minister die het Leefmilieu onder zijn bevoegdheid heeft, ieder wat hem betreft, de bijlagen van dit koninklijk besluit aanpassen.

Art. 3. Onze Minister van Volksgezondheid, Onze Minister van Tewerkstelling en Arbeid en Onze Staatssecretaris voor Leefmilieu zijn, ieder wat hem betreft, belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw en de Kleine
en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

— l'annexe VII D, dispositions spécifiques relatives aux dossiers techniques (niveau de base) contenus dans les notifications visées à l'article 2, § 6, relatives aux polymères.

— L'annexe VIII est remplacée par l'annexe VIII, renseignements et essais complémentaires requis conformément à l'article 2, § 1^{er}, 2°.

— L'annexe IX est remplacée par l'annexe IX de cet arrêté et comprend :

partie A, dispositions relatives aux fermetures de sécurité pour les enfants;

partie B, dispositions relatives aux dispositifs permettant de détecter les dangers au toucher.

Une annexe X, guide pour l'élaboration des fiches de données de sécurité est ajoutée au présent arrêté.

§ 2. Pour l'évaluation des risques des substances, les annexes suivantes du présent arrêté sont ajoutées comme annexes à l'arrêté royal du 24 mai 1982 :

— L'annexe ERB I, évaluation des risques : santé humaine (toxicité);

— L'annexe ERB II, évaluation des risques : santé humaine (propriétés physico-chimiques);

— L'annexe ERB III, évaluation des risques : environnement;

— L'annexe ERB IV, intégration générale des conclusions;

— L'annexe ERB V, informations devant figurer dans le résumé de l'évaluation des risques.

§ 3. Le Ministre de la Santé publique, le Ministre de l'Emploi et du Travail et le Ministre qui a l'Environnement dans ses attributions, chacun en ce qui le concerne, peuvent, si nécessaire, adapter les annexes de cet arrêté.

Art. 3. Notre Ministre de la Santé publique, Notre Ministre de l'Emploi et du Travail et Notre Secrétaire d'Etat à l'Environnement sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Bijlage I

Lijst van de gevaarlijke stoffen

Als lijst van de gevaarlijke stoffen voor deze bijlage geldt de bijlage III, deel I, van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Bijlage II

Symbolen voor het kenmerken

Voor het kenmerken gelden de gevaarssymbolen opgenomen in bijlage III, deel II van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Annexe I

Liste des substances dangereuses

La liste des substances dangereuses mentionnée à cette annexe est identique à celle qui figure à l'annexe III, partie I de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Annexe II

Symboles pour l'étiquetage

En matière d'étiquetage, sont valables les symboles de danger repris à l'annexe III, partie II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi, modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Bijlage III

Aard der bijzondere gevaren
toegeschreven aan gevaarlijke stoffen

Voor het kenmerken gelden de standaardzinnen, nopens de aard der bijzondere gevaren toegeschreven aan gevaarlijke stoffen, opgenomen in bijlage III, deel II van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Bijlage IV

Veiligheidsaanbevelingen met betrekking tot gevaarlijke stoffen

Voor het kenmerken gelden de veiligheidsaanbevelingen opgenomen in bijlage III, deel II van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Annexe III

Nature des dangers particuliers
attribués aux substances dangereuses

En matière d'étiquetage, sont valables les phrases-types, relatives à la nature des dangers particuliers attribués aux substances dangereuses, reprises à l'annexe III, partie II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi, modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Annexe IV

Conseils de prudence relatifs aux substances dangereuses

En matière d'étiquetage, sont valables les conseils repris à l'annexe III, partie II de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi, modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Bijlage V. — Methoden voor de bepaling van de fysisch-chemische eigenschappen, de toxiciteit en de ecotoxiciteit

INLEIDING

In deze bijlage worden de methoden uiteengezet voor de bepaling van de fysisch-chemische, toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen die zijn opgesomd in bijlage VII en in bijlage VIII van dit besluit. De methoden zijn gebaseerd op die welke zijn erkend en aanbevolen door bevoegde internationale organen (in het bijzonder de OESO).

Indien dergelijke methoden niet beschikbaar waren, is gebruik gemaakt van nationale normen of wetenschappelijk overeengekomen methoden. Over het algemeen moeten de tests worden verricht met de stof, zoals die in de handel wordt gebracht. Aandacht moet worden besteed aan de mogelijke invloed van verontreinigingen op de testresultaten.

Indien de methoden van deze bijlage niet geschikt zijn voor onderzoek van een bepaalde eigenschap, moet de gebruikte alternatieve methode worden gemotiveerd.

Dierproeven dienen te worden uitgevoerd overeenkomstig de in elk land geldende voorschriften, waarbij men zich tevens moet laten leiden door de thans alom heersende opvattingen op het gebied van het dierlijk welzijn.

Bij gelijkwaardige testmethoden moet die gebruikt worden, die de minste dierenoffers eist.

DEEL A : METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

A.1. SMELT-/VRIESTEMPERATUUR

1. METHODE

De meeste van de beschreven methoden berusten op de testrichtlijnen van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in de referenties (2) en (3).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden en toestellen dienen te worden toegepast voor de bepaling van de smelttemperatuur van stoffen, ongeacht de mate van zuiverheid ervan.

De keuze van de methode hangt af van de aard van de te onderzoeken stof. De beperkende factor zal dan ook worden bepaald door de vraag of de stof al dan niet gemakkelijk, moeilijk of helemaal niet kan worden verpulverd.

Voor sommige stoffen is de bepaling van de vries- of stoltemperatuur zinvoller; ook de normen voor deze bepaling werden in de methode opgenomen.

Indien, als gevolg van de specifieke eigenschappen van de stof, geen van de bovenstaande parameters eenvoudig kan worden gemeten, kan een vloeipunt geschikt zijn.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Onder smelttemperatuur wordt verstaan de temperatuur, waarbij de faseovergang van vaste naar vloeibare toestand optreedt bij normale atmosferische druk; deze temperatuur komt in het ideale geval overeen met de vriestemperatuur.

Aangezien de faseovergang bij veel stoffen over een temperatuurbereik plaatsvindt, wordt deze vaak omschreven als het smelttraject.

Smelttemperatuur en -traject worden steeds uitgedrukt in K.

$$t = T - 273,15$$

t : Celsius-temperatuur, graden Celsius (°C)

T : thermodynamische temperatuur, Kelvin (K)

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om van tijd tot tijd de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

In de referenties worden enige ijkstoffen genoemd (4).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

De temperatuur (het temperatuurbereik), waarbij fase-overgang van vaste naar vloeibare of van vloeibare naar vaste toestand plaatsvindt, wordt bepaald. In de praktijk betekent dit dat een monster van de te onderzoeken stof bij atmosferische druk wordt verwarmd/gekoeld en dat de temperatuur in het begin- en het eindstadium van het smelt-/vriesproces wordt bepaald. Vijf onderzoeksmethoden worden beschreven, namelijk : de capillaire methode, de methode met de verhitte plaat, de methode voor bepaling van de vriestemperatuur, thermische-analysmethoden, alsmede de bepaling van het vloeipunt (zoals ontwikkeld voor minerale oliën).

In sommige gevallen kan het gemakkelijker zijn de vriestemperatuur te bepalen in plaats van de smelttemperatuur.

1.4.1. Capillaire methode

1.4.1.1. Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een vloeistofbad

Een kleine hoeveelheid van de verpulverde stof wordt in een capillair gebracht en stevig aangedrukt. Het buisje wordt samen met een thermometer verwarmd, waarbij ervoor wordt gezorgd dat de temperatuurstijging tijdens het eigenlijke smeltproces minder dan circa 1 K/min bedraagt. De temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces wordt bepaald.

1.4.1.2. Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een metalen blok

Als omschreven in 1.4.1.1, met dit verschil dat het capillair en de thermometer in een verwarmd metalen blok zijn aangebracht en door openingen in het blok kunnen worden waargenomen.

1.4.1.3. Fotocel detectie

Het monster in het capillair wordt automatisch verhit in een metalen cilinder. Een lichtbundel wordt, via openingen in de cilinder, door de stof heen op een nauwkeurig geijkte fotocel gericht. De optische eigenschappen van de meeste stoffen veranderen van ondoorschijnend naar doorschijnend bij het smelten. Zodra de lichtintensiteit die de fotocel bereikt toeneemt, zendt deze een stopsignaal naar de digitale meter die de temperatuur afleest van een thermometer met platinaweerstand in de verwarmingskamer. Deze methode leent zich niet voor toepassing op sommige sterk gekleurde stoffen.

1.4.2. Methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage)

1.4.2.1. De verhitte staaf volgens Kofler

De verhitte staaf volgens Kofler bestaat uit twee stukken metaal die een verschillend warmtegeleidingsvermogen bezitten en elektrisch worden verwarmd. De staaf is zo ontworpen dat de temperatuur nagenoeg lineair langs de lengte ervan varieert. De temperatuur van de verhitte staaf kan variëren van 283 K tot 573 K; de temperatuur wordt met een

voor elke staaf afzonderlijk geijkt ruitertje (met wijzer) afgelezen. Om een smelttemperatuur te bepalen, wordt de stof in een dunne laag direct op het oppervlak van de verhitte staaf gebracht. Binnen enkele seconden ontstaat er een scherpe scheidingslijn tussen de vloeibare en de vaste fase. De wijzer wordt ingesteld op de scheidingslijn, waarna de temperatuur kan worden afgelezen.

1.4.2.2. Smeltpuntmicroscop

Er bestaan verschillende verhitte platen voor microscopische smelttemperatuurbepaling waarbij met zeer kleine hoeveelheden materiaal kan worden gewerkt. Bij de meeste verhitte platen wordt de temperatuur gemeten met een gevoelig thermokoppel, maar bij sommige met een kwikthermometer. Een toestel voor microscopische bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een verhitte plaat bestaat meestal uit een verwarmingskamer met een metalen plaat waarop het monster op een voorwerp-glaasje wordt geplaatst. In het midden van de metalen plaat is een opening aangebracht zodat deze het licht van de microscoop doorlaat. Tijdens het gebruik wordt, om lucht uit de verwarmingskamer te weren, deze met een glazen plaat afgesloten.

De verwarming van het monster wordt ingesteld met een regelweerstand. Voor zeer nauwkeurige metingen bij optisch anisotrope stoffen kan gebruik worden gemaakt van gepolariseerd licht.

1.4.2.3. De meniscusmethode

Deze methode wordt speciaal toegepast voor polyamiden.

Bepaling van de temperatuur, waarbij de verplaatsing van een meniscus van siliconenolie die tussen een verhit oppervlak (hot stage) en een dekglas, geplaatst op het te onderzoeken polyamidemonster, is ingesloten, visueel wordt waargenomen.

1.4.3. Methode voor de bepaling van de vriestemperatuur

Het monster wordt in een speciaal proefbuisje in een toestel geplaatst voor de bepaling van de vriestemperatuur. Tijdens de afkoeling wordt het monster voortdurend zachtjes geroerd en de temperatuur wordt regelmatig afgelezen en geregistreerd. Zodra de temperatuur gedurende enkele aflezingen constant blijft, wordt deze temperatuur (na correctie voor afwijking van de thermometer) geregistreerd als de vriestemperatuur.

Onderkoeling moet worden voorkomen door een evenwicht te bewaren tussen de vaste en de vloeibare fase.

1.4.4. Thermische analyse

1.4.4.1. Differentiële thermische analyse (DTA)

Met deze techniek wordt het verschil in temperatuur geregistreerd tussen de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden blootgesteld. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme (smelten) of exotherme (bevriezen) afwijking van de basislijn van de temperatuurregistratie.

1.4.4.2. Differentiële scanningcalorimetrie (DSC)

Deze techniek registreert het verschil tussen de energieopname van de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden onderworpen. Deze energie is de energie die nodig is om dezelfde temperatuur voor beide stoffen te bereiken. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme (smelten) of exotherme (bevriezen) afwijking van de basislijn van de warmtestroomregistratie.

1.4.5. Vloeipunt

Deze methode werd ontwikkeld voor minerale oliën en is bruikbaar voor olieachtige stoffen met lage smelttemperaturen.

Na voorafgaande verwarming wordt het monster afgekoeld met een specifieke snelheid en telkens, iedere 3 K, onderzocht op vloeikarakteristieken. De laagste temperatuur waarbij nog beweging van de vloeistof wordt gezien, wordt genoteerd als het vloeipunt.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van smelttemperaturen/smeltrajecten staat vermeld in de tabel.

TABEL: TOEPASBAARHEID VAN DE METHODEN

A. Capillaire methode

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Smelttemperatuurtoestellen met vloeistofbad	Ja	Enkele	273 tot 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Smelttemperatuurtoestellen met metalen blok	Ja	Enkele	293 tot > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotocel detectie	Ja	Verscheidene met toepassing van hulpapparatuur	253 tot 573 K	± 0,5 K	

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof

B. Methode waarbij gebruik wordt gemaakt van een verhit oppervlak (hot stage) en methode voor de bepaling van de vriestemperatuur

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Verhitte staaf volgens Kofler	Ja	Neen	283 tot > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Smeltpunt-microscoop	Ja	Enkele	273 tot > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniscus-methode	Neen	Specifiek voor polyamiden	293 tot > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Vriestemperatuurmethode	Ja	Ja	223 tot 573 K	± 0,5 K	zoals BS 4695

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof

C. Thermische analyse

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurigheid (1)	Bestaande norm
Differentiële thermische analyse	Ja	Ja	173 tot 1 273 K	tot 600 K ± 0,5 K tot 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differentiële scanningcalorimetrie	Ja	Ja	173 tot 1 273 K	tot 600 K ± 0,5 K tot 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof

D. Vloeipunt

Meetmethode	Stoffen die kunnen verpulveren	Stoffen die niet vlot verpulveren	Temperatuurbereik	Geschatte nauwkeurig (1)	Bestaande norm
Vloeipunt	Voor minerale oliën en olieachtige stoffen	Voor minerale oliën en olieachtige stoffen	223 tot 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

(1) Afhankelijk van het type instrument en de graad van zuiverheid van de stof

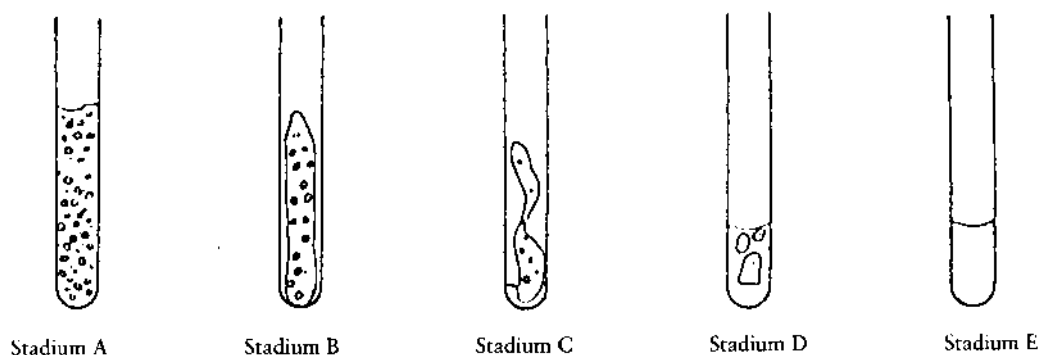
1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

De aan te houden werkwijzen van bijna alle testmethoden staan beschreven in internationale en nationale normen (zie aanhangsel 1).

1.6.1. Methoden waarbij gebruik wordt gemaakt van een capillair

Bij een trage temperatuurstijging zullen verpulverde stoffen doorgaans volgens de in figuur 1 weergegeven stadia verlopen.

Figuur 1



Stadium A (begin van het smeltproces): fijne druppeltjes hangen op uniforme wijze aan de binnenwand van het capillair.

Stadium B er ontstaat ruimte tussen het monster en de binnenwand wegens krimpen van het monster.

Stadium C het gekrompen monster begint in te storten en wordt vloeibaar.

Stadium D op de oppervlakte wordt een volledige meniscus gevormd, maar een aanzienlijk gedeelte van het monster is nog vast.

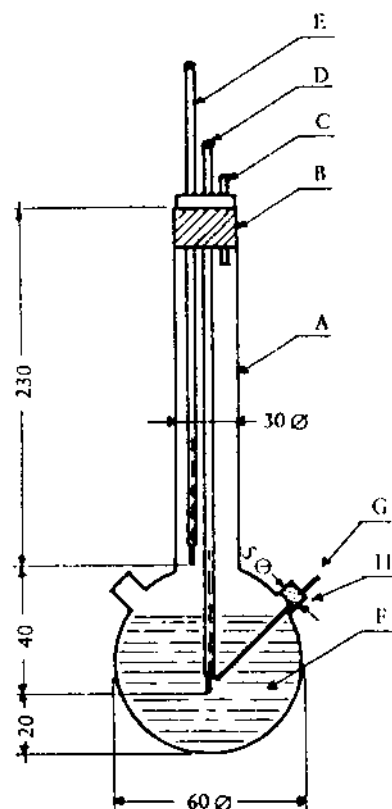
Stadium E (eindstadium van het smeltproces): er zijn geen vaste deeltjes meer.

Tijdens de smelttemperatuurbepaling wordt de temperatuur in het begin- en eindstadium van het smeltproces geregistreerd.

1.6.1.1. Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een vloeistofbad

In figuur 2 is een genormaliseerd glazen apparaat voor smelttemperatuurbepaling (JIS K 0064) afgebeeld. Alle specificaties zijn opgegeven in mm.

Figuur 2



- A: Meetvat
- B: Kurk
- C: Opening
- D: Thermometer
- E: Hulphetermometer
- F: Vloeistofbad
- G: Glazen capillair met een lengte van 80 tot 100 mm inwendige zijdelingse diameter: $1,0 \pm 0,2$ mm, wanddikte: 0,2 tot 0,3 mm
- H: Zijbuis

Badvloeistof

Er moet een geschikte badvloeistof bepaald worden. De keuze van de vloeistof is afhankelijk van de smelttemperatuur van de te onderzoeken stof, bij voorbeeld vloeibare paraffine voor stoffen met een smelttemperatuur van maximaal 473 K, siliconenolie voor stoffen met een smelttemperatuur van maximaal 573 K.

Voor stoffen met een smelttemperatuur hoger dan 523 K kan een mengsel, bestaande uit drie delen zwavelzuur en twee delen kaliumsulfaat (naar massa), worden gebruikt. Passende voorzorgsmaatregelen dienen te worden genomen wanneer een dergelijk mengsel wordt gebruikt.

Thermometer

Er mag alleen gebruik worden gemaakt van thermometers die aan de eisen in de volgende of daarmee overeenkomende normen voldoen :

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

Werkwijze

De droge stof wordt verpulverd in een mortier en in een aan één uiteinde dichtgesmolten capillair gebracht en wel zo dat het niveau van de vulling, nadat de stof stevig is aangedrukt, circa 3 mm bedraagt. Ten einde een gelijkvormig aangedrukt monster te verkrijgen, laat men het capillair vanaf een hoogte van circa 700 mm door een glazen buis verticaal op een horlogeglas vallen.

Het gevulde capillaire buisje wordt in een bad geplaatst en wel zo dat het midden van de kwikbol van de thermometer het capillair ter hoogte van het monster aanraakt. Doorgaans wordt het capillair in het toestel gebracht bij ongeveer 10 K beneden de smelttemperatuur.

De badvloeistof wordt zodanig verwarmd dat de temperatuurstijging circa 3 K/min bedraagt. De vloeistof moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden de verwachte smelttemperatuur wordt de snelheid van de temperatuurstijging ingesteld op ten hoogste 1 K/min.

Berekening

De smelttemperatuur wordt als volgt berekend :

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

waarin :

T = de gecorrigeerde smelttemperatuur, uitgedrukt in K

T_D = de van thermometer D afgelezen temperatuur, in K

T_E = de van thermometer E afgelezen temperatuur, in K

n = het aantal schaalverdelingen van het kwikdraad op het uitstekende gedeelte van thermometer D.

*1.6.1.2. Toestellen ter bepaling van de smelttemperatuur met behulp van een metalen blok**Apparatuur*

De apparatuur bestaat uit :

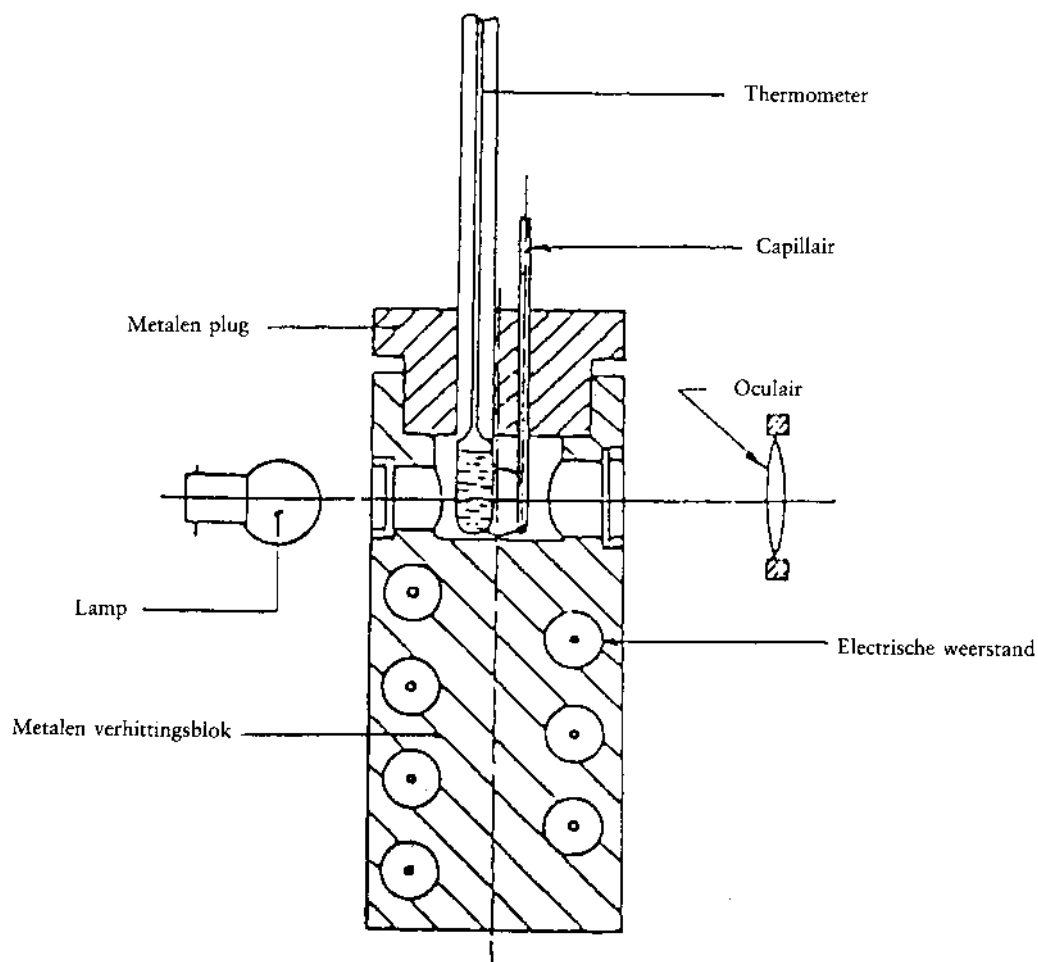
- een cilindervormig metalen blok, waarvan het bovenste gedeelte hol is en een kamer vormt (zie figuur 3);
 - een metalen stop met twee of meer openingen waarlangs buisjes in het metalen blok kunnen worden gebracht;
 - een verwarmingssysteem voor het metalen blok, bij voorbeeld een in het blok ingesloten elektrische weerstand;
 - een regelbare weerstand voor de stroomtoevoer, indien van elektrische verwarming gebruik wordt gemaakt;
 - in de zijwanden van de kamer, in rechte hoeken ten opzichte van elkaar, vier vensters van hittebestendig glas;
- voor één van deze vensters is een oculair aangebracht, waardoor het capillair kan worden waargenomen, de overige drie vensters worden gebruikt voor de verlichting van de kamer en inhoud daarvan;
- een aan één uiteinde gesloten capillair van hittebestendig glas (zie 1.6.1.1).

Thermometer

Zie de in 1.6.1.1 genoemde normen.

Thermo-elektrische meetinstrumenten van vergelijkbare nauwkeurigheid kunnen ook worden gebruikt.

Figuur 3



1.6.1.3. *Fotoceldetectie**Apparatuur en werkwijze :*

Het apparaat bestaat uit een metalen kamer met een geautomatiseerd verwarmingssysteem. Drie capillairen worden overeenkomstig 1.6.1.1 gevuld en in de oven geplaatst.

Er zijn verscheidene lineaire temperatuurstijgingen beschikbaar voor het ijken van het apparaat; de gewenste temperatuurstijging wordt elektrisch ingesteld met een van tevoren gekozen constante snelheid en heeft een lineair verloop. Recorders geven de werkelijke oventemperatuur en de temperatuur van de stof in het capillair aan.

1.6.2. **Verwarmde oppervlakken (hot stages)**1.6.2.1. *De verhitte staaf volgens Kofler*

Zie aanhangsel.

1.6.2.2. *Smeltpuntmicroscop*

Zie aanhangsel.

1.6.2.3. *Meniscusmethode (polyamiden)*

Zie aanhangsel.

De opwarmingsnelheid bij temperaturen in de buurt van de smelttemperatuur moet minder zijn dan 1 K/min.

1.6.3. **Methoden voor de vriestemperatuurbepaling**

Zie aanhangsel.

1.6.4. **Thermische analyse**1.6.4.1. *Differentiële thermische analyse*

Zie aanhangsel.

1.6.4.2. *Differentiële scanningcalorimetrie*

Zie aanhangsel.

1.6.5. **Bepaling van het vloeipunt**

Zie aanhangsel.

2. **GEGEVENS**

Soms is een thermometercorrectie noodzakelijk.

3. **RAPPORTAGE**

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- de gebruikte methode;
- de nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering;
- een schatting van de nauwkeurigheid.

Het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de geschatte nauwkeurigheidsgrenzen (zie tabellen) vallen, wordt gerapporteerd als smelttemperatuur.

Als het temperatuurverschil tussen het beginpunt en het eindpunt van het smelten binnen de nauwkeurigheidsgrenzen van de methode valt, wordt de temperatuur van het eindstadium genomen als de smelttemperatuur; zo niet, dan moeten beide temperaturen worden gerapporteerd.

Als ontleding of sublimatie van de onderzochte stof optreedt voordat de smelttemperatuur is bereikt, dient de temperatuur waarbij dit effect optreedt, te worden gerapporteerd.

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

4. **LITERATUUR**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102—Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.
- (3) R. Weissberger ed.: Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter VII.
- (4) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, 1976, Vol. 48, 505-515.

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd.

1. **Capillaire methoden**

1.1. Smelttemperatuurtoestellen met een vloeistofbad

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. Smelttemperatuurtoestellen met een metalen blok

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E) Plastics—polyamides—determination of "melting point"

2. **Hete oppervlakken**

2.1. Verwarmde staaf volgens Kofler

ANSI/ASTM D 3451-76 Standard recommended practices for testing polymeric powder coatings

2.2. Smeltpuntmicroscop

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniscusmethode (polyamiden)

ISO 1218 (E) Plastics — polyamides — determination of "melting point"

ANSI/ASTM D 2133-66 Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

NF T 51-050 Résines de polyamides. Détermination du "point de fusion". Méthode du ménisque.

3. Methoden voor vriestemperatuurbepaling

BS 4633 Method for the determination of crystallizing point
BS 4695 Method for determination of melting point of petroleum wax (cooling curve)
DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
ISO 2207 Cires de pétrole : détermination de la température de figeage
DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114 Point de fusion des paraffines
NF T.20-051 Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

4. Thermische analyse

4.1. Differentiële thermische analyse

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Differentiële scanningcalorimetrie

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

5. Bepaling van het vloeipunt

NBN 52014 Echantillonnage et analyse des produits du pétrole : point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontleding van aardolieprodukten : Troebelingspunt en vloeipunt

ASTM D 97-66 Standard test method for pour point of petroleum oils
ISO 3016 Petroleum oils — Determination of pour point

A.2. KOOKTEMPERATUUR

1. METHODE

De meeste van de beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in de referenties (2) en (3).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden en toestellen kunnen worden toegepast op vloeistoffen en op bij lage temperatuur smeltende stoffen, welke beneden de kooktemperatuur geen chemische reactie ondergaan (bijvoorbeeld : auto-oxidatie, omlegging, ontleding, enz.). De methoden zijn van toepassing op zuivere en onzuivere vloeistoffen.

De meeste aandacht wordt gegeven aan de fotocel detectiemethode en thermische analysemethode, omdat hiermee zowel smelt- als kooktemperaturen kunnen worden bepaald. Bovendien kunnen deze metingen worden geautomatiseerd.

Het voordeel van de dynamische methode is, dat deze ook kan worden toegepast voor de bepaling van de dampspanning en dat het niet nodig is de kooktemperatuur te corrigeren tot normale druk (101,325 kPa) omdat de normale druk tijdens de meting kan worden ingesteld met behulp van een manostaat.

Opmerkingen :

De invloed van verontreinigingen op de bepaling van de kooktemperatuur is sterk afhankelijk van de aard van de verontreiniging. Indien in het monster vluchtige verontreinigingen aanwezig zijn, die de resultaten zouden kunnen beïnvloeden, kan de stof worden gezuiverd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De normale kooktemperatuur wordt gedefinieerd als de temperatuur waarbij de dampdruk van een vloeistof gelijk is aan 101,325 kPa.

Als de kooktemperatuur niet wordt gemeten bij normale atmosferische druk, kan de temperatuur-afhankelijkheid van de dampdruk worden beschreven met de vergelijking van Clausius-Clapeyron :

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

waarin:

p = de dampspanning van de stof in pascal (Pa)

ΔH_v = de verdampingswarmte in J mol^{-1}

R = de universele molaire gasconstante = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = de thermodynamische temperatuur in K.

Bij vermelding van de kooktemperatuur moet de druk tijdens de meting worden opgegeven.

Herleidingen

Druk (eenheid: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa
(„bar” is nog toegestaan, doch het gebruik hiervan wordt niet aanbevolen).

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr
(de eenheden mm Hg en Torr zijn niet meer toegestaan).

1 atm = standaardatmosfeer = 101 325 Pa
(de eenheid „atm” is niet toegestaan)

Temperatuur (eenheid : K)

$t = T - 273,15$

t : Celsius temperatuur, graden Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

T : thermodynamische temperatuur, kelvin (K)

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijking met de resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

Een aantal ijkstoffen is te vinden in de methoden die zijn opgenomen in het aanhangsel.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Vijf methoden voor de bepaling van de kooktemperatuur (of kooktraject) berusten op de meting van de kooktemperatuur, twee andere op thermische analyse.

1.4.1. Bepaling met behulp van een ebullioscoop

De ebullioscoop is oorspronkelijk ontwikkeld voor de bepaling van het molecuulgewicht via de kooktemperatuurverhoging, doch leent zich ook voor nauwkeurige metingen van de kooktemperatuur. Een zeer eenvoudig toestel is beschreven in ASTM D 1120-72 (zie aanhangsel). De vloeistof wordt in dit toestel onder evenwichtscondities bij atmosferische druk verwarmd totdat zij kookt.

1.4.2. Dynamische methode

Bij deze methode meet men de condensatietemperatuur van de damp met behulp van een geschikte thermometer in de reflux tijdens het koken. De druk kan bij deze methode worden gevarieerd.

1.4.3. Destillatiemethode voor kooktemperatuur

Bij deze methode destilleert men de vloeistof en meet men de condensatietemperatuur van de damp, alsmede de hoeveelheid destillaat.

1.4.4. Methode volgens Siwoloboff

Bij deze methode verwarmt men het monster in een monsterbuisje, dat in een verwarmd vloeistofbad wordt gehouden. Een dichtgesmolten capillair met een luchtbel onderin wordt in het monsterbuisje gebracht.

1.4.5. Fotoceldetectie

Naar het beginsel volgens Siwoloboff worden de opstijgende bellen automatisch gemeten met een fotocel.

1.4.6. Differentiële thermische analyse

Met deze techniek wordt het verschil in temperatuur geregistreerd tussen de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden blootgesteld. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie, zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme afwijking (koken) van de basislijn van de temperatuurregistratie.

1.4.7. Differentiële scanningcalorimetrie

Deze techniek registreert het verschil tussen de energieopname van de te onderzoeken stof en een referentiestof als functie van de temperatuur, wanneer beide stoffen aan hetzelfde gecontroleerde temperatuurprogramma worden onderworpen. Deze energie is de energie die nodig is om dezelfde temperatuur voor beide stoffen te bereiken. Als het monster een faseovergang doormaakt met verandering van enthalpie zal deze verandering aangetoond worden door een endotherme afwijking (koken) van de basislijn van de warmtestroomregistratie.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

De toepasbaarheid en nauwkeurigheid van de verschillende methoden voor de bepaling van de kooktemperatuur/kooktraject staan vermeld in tabel 1.

TABEL 1: VERGELIJING VAN DE METHODEN

Meetmethode	Geschatte nauwkeurigheid	Bestaande Norm
Ebullioscoop	$\pm 1,4$ K (tot 373 K) ⁽¹⁾⁽²⁾ $\pm 2,5$ K (tot 600 K) ⁽¹⁾⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dynamische methode	$\pm 0,5$ K (tot 600 K) ⁽²⁾	
Destillatiemethode (kooktraject)	$\pm 0,5$ K (tot 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Volgens Siwoloboff	± 2 K (tot 600 K) ⁽²⁾	
Fotocel detectie	$\pm 0,3$ K (bij 373 K) ⁽²⁾	
Differentiële thermische analyse	$\pm 0,5$ K (tot 600 K) $\pm 2,0$ K (tot 1 273 K)	ASTM E 537-76
Differentiële scanning-calorimetrie	$\pm 0,5$ K (tot 600 K) $\pm 2,0$ K (tot 1 273 K)	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor eenvoudige toestellen zoals bijvoorbeeld beschreven in ASTM D 1120-72; de nauwkeurigheid kan worden verbeterd met meer verfijnde versies van de ebullioscoop.
⁽²⁾ Deze nauwkeurigheid geldt alleen voor zuivere stoffen. Het gebruik in andere omstandigheden moet verantwoord worden.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODEN

De werkwijzen van een aantal testmethoden zijn beschreven in internationale en nationale normen (zie aanhangsel).

1.6.1. Ebullioscoop

Zie aanhangsel.

1.6.2. Dynamische methode

Zie testmethode A.4 voor de bepaling van de dampspanning.
De waargenomen kooktemperatuur bij een druk van 101,325 kPa wordt geregistreerd.

1.6.3. Destillatiemethode (kooktraject)

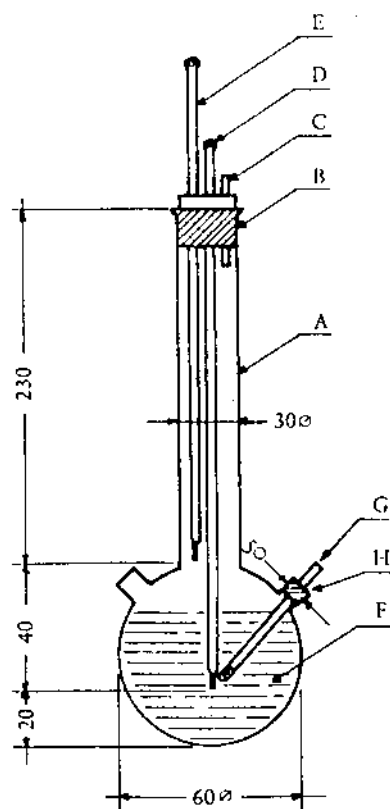
Zie aanhangsel.

1.6.4. Methode volgens Siwoloboff

Het monster wordt verwarmd in een smelttemperatuurtoestel in een monsterbuisje met een diameter van ongeveer 5 mm (figuur 1).

In figuur 1 staat een standaardapparaat voor de bepaling van de smelt- en kooktemperatuur (JIS K 0064) afgebeeld (glas, alle afmetingen in mm).

Figuur 1



- A: Meetvat
 B: Kurk
 C: Opening
 D: Thermometer
 E: Hulpthermometer
 F: Vloeistofbad
 G: Monsterbuisje: buitendiameter maximaal 5 mm; met daarin een capillair met een lengte van ongeveer 100 mm en een binnendiameter van circa 1 mm en een wanddikte van circa 0,2 tot 0,3 mm
 H: Zijbuis

Een capillair (kookcapillair) dat op ongeveer 1 cm boven het ondereind is dichtgesmolten, wordt in het monsterbuisje gebracht. Het monsterbuisje wordt met de te onderzoeken stof gevuld, totdat het dichtgesmolten deel van het capillair zich onder het vloeistofoppervlak bevindt. Het monsterbuisje met het kookcapillair wordt met een elastiekje aan de thermometer bevestigd of met een zijstuk vastgezet (zie figuur 2).

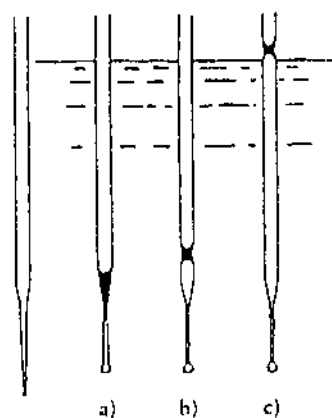
Figuur 2

Beginsel volgens Siwoloboff



Figuur 3

Gewijzigd beginsel



De badvloeistof wordt gekozen aan de hand van de kooktemperatuur. Bij temperaturen tot 573 K kan siliconenolie worden gebruikt. Vloeibare paraffine mag slechts worden gebruikt bij temperaturen tot 473 K. De verwarming van het vloeistofbad moet zo geregeld zijn, dat de temperatuur aanvankelijk 3 K/min stijgt. Het vloeistofbad moet worden geroerd. Bij ongeveer 10 K beneden de verwachte kooktemperatuur moet de verwarming zo worden ingesteld dat de temperatuur met minder dan 1 K/min stijgt. Zodra de kooktemperatuur wordt bereikt, beginnen er snel belletjes uit het kookcapillair te komen.

De kooktemperatuur wordt bereikt wanneer, bij tijdelijke afkoeling, de bellenvorming stopt en de vloeistof plotseling in het capillair omhoog komt. De bijbehorende stand van de thermometer is de kooktemperatuur van de te onderzoeken stof.

Bij het gewijzigd beginsel (figuur 3) wordt de kooktemperatuur bepaald in een smelttemperatuurcapillair. Deze wordt uitgetrokken tot een fijne punt van ongeveer 2 cm lengte, waarin een geringe hoeveelheid van het monster wordt opgezogen. Het open einde van de fijne punt wordt dicht gesmolten, zodat er zich onderin een kleine luchtbel bevindt (a). Bij verwarming in het smelttemperatuur toestel (b) zet de luchtbel uit. De kooktemperatuur komt overeen met de temperatuur waarbij de prop van de te onderzoeken stof op het niveau van het vloeistofoppervlak komt (c).

1.6.5. Fotoceldetectie

Het monster wordt verwarmd in een capillair in een verwarmd metaalblok.

Via geschikte openingen in het blok wordt een lichtbundel door de stof heen op een zorgvuldig geijkte fotocel gericht.

Terwijl de temperatuur van het monster oploopt, komen er luchtbelllen uit het kookcapillair. Wanneer de kooktemperatuur wordt bereikt, neemt het aantal belllen flink toe. Hierbij verandert de intensiteit van het licht dat op de cel valt, waardoor het apparaat wordt stilgezet dat de temperatuur afleest van een thermometer met platina weerstand die in het blok is gemonteerd.

Deze methode is bijzonder nuttig omdat hiermee ook bepalingen mogelijk zijn beneden kamertemperatuur tot 253,15 K (-20 °C) zonder enige veranderingen in de apparatuur. Het instrument moet alleen in een koelbad worden geplaatst.

1.6.6. Thermische analyse

1.6.6.1. Differentiële thermische analyse

Zie aanhangsel.

1.6.6.2. Differentiële scanningcalorimetrie

Zie aanhangsel.

2. GEGEVENS

Bij kleine afwijkingen van de normale druk (max. ± 5 kPa) worden de kooktemperaturen genormaliseerd tot T_n met behulp van de volgende numerieke vergelijking van Sidney Young :

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

waarin:

$\Delta p = (101,325 - p)$, [let op het teken]

p = barometerstand in kPa,

f_T = tempo waarin de kooktemperatuur verandert met de druk in K/kPa,

T = gemeten kooktemperatuur in K,

T_n = kooktemperatuur gecorrigeerd tot normale druk in K.

De temperatuurcorrectiefactoren f_T en de vergelijkingen voor de benadering daarvan zijn opgenomen in de internationale en nationale normen die hierboven voor een groot aantal stoffen zijn genoemd.

Zo worden bijvoorbeeld in de methode DIN 53171 de volgende (bij benadering) correcties vermeld voor oplosmiddelen in verf (zie tabel 2).

TABEL 2: TEMPERATUURCORRECTIEFACTOREN f_T

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

3. RAPPORTAGE

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- de gebruikte methode;
- een nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering;
- een schatting van de nauwkeurigheid;

Het gemiddelde van ten minste twee metingen die binnen de geschatte nauwkeurigheidsgrenzen (zie tabel 1) vallen, wordt genoteerd als kooktemperatuur.

De gemeten kooktemperaturen en hun gemiddelde moeten worden opgegeven, alsmede de druk(ken), waarbij de metingen zijn uitgevoerd, in kPa. De druk dient bij voorkeur dicht bij de normale atmosferische druk te liggen.

Alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C(81)30 Final.
 (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II.
 (3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd :

1. Ebullioscoop

ASTM D 1120-72 Standard Test Method for Boiling Point of Engine Anti-freezes

2. Destillatieproces (kooktraject)

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

NF T 20-608 Distillation : détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. Differentiële thermische analyse en differentiële scanningcalorimetrie

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse : Begriffe

A.3. RELATIEVE DICHTHEID**1. METHODE**

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in referentie (2).

1.1. INLEIDING

De hieronder beschreven methoden voor het bepalen van de relatieve dichtheid zijn van toepassing op vaste stoffen en op vloeistoffen, ongeacht de zuiverheid van deze stoffen. De verschillende methoden zijn vermeld in tabel 1.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De relatieve dichtheid, D_4^{20} van vaste stoffen of vloeistoffen is de verhouding tussen de massa van een volume te onderzoeken stof bij 20 °C en de massa van hetzelfde volume water bij 4 °C. De relatieve dichtheid heeft geen dimensie.

De dichtheid, ρ , van een stof is het quotiënt van de massa m en het volume v van deze stof.

De dichtheid, ρ , wordt uitgedrukt in kg/m^3 (SI-eenheden).

1.3. REFERENTIESTOFFEN (1) (3)

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methodes mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Er worden vier soorten methoden gebruikt.

1.4.1. Methoden gebaseerd op de opwaartse kracht**1.4.1.1. Areometer** (hydrometer voor vloeistoffen)

Voldoende nauwkeurige en snelle dichtheidsbepalingen kunnen worden uitgevoerd met drijvende areometers; het gedeelte van de areometer dat in de vloeistof zakt, is bepalend voor de dichtheid van de vloeistof en kan van een schaalverdeling worden afgelezen.

1.4.1.2. Hydrostatische balans (voor vloeistoffen en vaste stoffen)

Het gewichtsverschil van een monster, gemeten in lucht en in een geschikte vloeistof (bij voorbeeld water), kan worden gebruikt om de dichtheid ervan te bepalen.

Voor vaste stoffen geldt de gemeten dichtheid slechts voor het bewuste monster. Voor het bepalen van de dichtheid van vloeistoffen wordt een voorwerp met volume v eerst in lucht en vervolgens in de testvloeistof gewogen.

1.4.1.3. Methode met ondergedompeld voorwerp (voor vloeistoffen) (4)

Bij deze methode wordt de dichtheid van een vloeistof bepaald aan de hand van het verschil tussen de resultaten van een weging van de vloeistof voor en na het onderdompelen van een voorwerp met bekend volume in de te onderzoeken vloeistof.

1.4.2. Methoden met de pyknometer

Voor vaste stoffen en vloeistoffen kunnen pyknometers van uiteenlopende vorm en met bekend volume worden gebruikt. De dichtheid wordt berekend uit het verschil in gewicht tussen de volle en de lege pyknometer en het bekende volume daarvan.

1.4.3. Vergelijkingspyknometer met lucht (voor vaste stoffen)

De dichtheid van een vaste stof in willekeurige vorm kan bij kamertemperatuur worden gemeten met behulp van een gasvergelijkingspyknometer. Het volume van een stof wordt in lucht of in een inert gas gemeten in een cilinder waarvan het variabele volume gekalibreerd is. Voor de berekening van de dichtheid wordt na meting van het volume een massameting verricht.

1.4.4. Oscillerende dichtheidsmeter (5) (6) (7)

De dichtheid van een vloeistof kan worden gemeten met behulp van een oscillerende dichtheidsmeter. Een mechanische oscillator in de vorm van een U-buis wordt in trilling gebracht bij de resonantiefrequentie van de oscillator die afhankelijk is van zijn massa. Bij het inbrengen van een monster verandert de resonantiefrequentie van de oscillator. Het apparaat moet worden geijkt met twee vloeistoffen van bekende dichtheid. Deze ijkstoffen moeten bij voorkeur zo worden gekozen dat de dichtheden ervan zich aan de uiteinden van het meetbereik bevinden.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

De toepasbaarheid van de verschillende methoden voor bepaling van de relatieve dichtheid staat vermeld in de tabel.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

Normen, die als voorbeeld kunnen worden geraadpleegd voor aanvullende technische gegevens, zijn bijgevoegd in het aanhangsel.

De proeven moeten worden uitgevoerd bij 20 °C en ten minste in tweevoud.

2. GEGEVENS

Zie normen.

3. RAPPORTAGE

In het eindverslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

— de gebruikte methode;

— een nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en, indien van toepassing, voorafgaande zuivering.

De relatieve dichtheid D_4^{20} dient te worden gerapporteerd zoals gedefinieerd onder 1.2, alsmede de fysische toestand van de onderzochte stof.

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

TABEL: TOEPASBAARHEID VAN DE METHODEN

Meetmethode	Dichtheid		Maximale dynamische viscositeit	Bestaande norm
	Vaste stof	Vloeistof		
1.4.1.1. Areometer		ja	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Hydrostatische balans				
a) vaste stof	ja			
b) vloeistof		ja	5 Pa S	ISO 1183 (A) ISO 901 en 758
1.4.1.3. Methode met ondergedompeld voorwerp		ja	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				
a) vaste stof	ja			
b) vloeistof		ja	500 Pa s	ISO 3507 ISO 1183 (B), NF T 20-053 ISO 758
1.4.3. Vergelijkingspyknometer met lucht	ja			DIN 55990 deel 3, DIN 53243
1.4.4. Oscillerende dichtheidsmeter		ja	5 Pa s	

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. 1, Part 1.
- (3) IUPAC, Recommended reference materials for realisation of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- (4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm; 1979, Vol. 11, 427-430.
- (5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297-302.
- (6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717-726.
- (7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253-255.

Aanhangsel

Voor aanvullende technische gegevens kunnen de volgende normen als voorbeeld worden geraadpleegd :

1. METHODEN GEBASEERD OP DE OPWAARTSE KRACHT

1.1. Areometer

DIN 12790, ISO 387 Areometer; algemene aanwijzingen

DIN 12791 Deel I : Dichtheidsareometers : constructie, instelling en gebruik

Deel II : Dichtheidsareometers : genormaliseerde maten, benaming.

Deel III : Gebruik en test

ISO 649-2 Laboratoriumglaswerk : Dichtheidsareometers voor algemeen gebruik

NF T 20-050 Chemische producten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vloeistoffen — Areometermethode

DIN 12793 Laboratoriumglaswerk : areometers voor bepaling van het meetbereik

1.2. Hydrostatische balans

Voor vaste stoffen

ISO 1183 Methode A : Methodes voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen met uitzondering van schuimplastics

NF T 20-049 Chemische produkten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen uitgezonderd poeders en schuimprodukten — Hydrostatische balansmethode

ASTM D 792 Soortelijk gewicht en dichtheid van kunststoffen door verplaatsing.

DIN 53479 Proeven voor kunststoffen en elastomeren : bepaling van de dichtheid.

Voor vloeistoffen

ISO 901 ISO 758

DIN 51757 Proeven voor minerale oliën en verwante materialen : bepaling van de dichtheid

ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 en ASTM D 1481-62

ASTM D 1298 Dichtheid, soortelijk gewicht of API-gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieprodukten met de areometermethode

BS 4714 Dichtheid, soortelijk gewicht of API-gewicht van ruwe aardolie en vloeibare aardolieprodukten met de areometermethode

1.3. Methode met ondergedompeld voorwerp

DIN 53217 Proeven voor verf, vernis en soortgelijke produkten; dichtheidsbepaling met de methode met ondergedompeld voorwerp

2. PYKNOMETERMETHODEN

2.1. Voor vloeistoffen

ISO 3507 Pyknometers

ISO 758 Vloeibare chemische produkten; bepaling van de dichtheid bij 20 °C

DIN 12797 Gay-Lussac pyknometer (voor niet-vluchtige vloeistoffen die niet al te visceus zijn)

DIN 12798 Lipkin pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische

viscositeit van minder dan $100,10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ bij 15 °C)

DIN 12800 Sprengel pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12798)

DIN 12801 Reischauer pyknometer (voor vloeistoffen met een kinematische viscositeit van minder dan $100,10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ bij 20 °C, vooral ook toepasbaar op koolwaterstoffen en oplossingen in water, alsmede op vloeistoffen met een hogere dampdruk, ongeveer 1 bar bij 90 °C)

DIN 12806 Hubbard pyknometer (voor alle soorten visceuze vloeistoffen met een niet al te hoge dampdruk, in het bijzonder voor verven, vernissen en bitumen)

DIN 12807 Bingham pyknometer (voor vloeistoffen zoals in DIN 12801)

DIN 12808 Jaulmes pyknometer (in het bijzonder voor mengsels van ethanol en water)

DIN 12809 Pyknometer met ingeslepen thermometer en capillaire zijbuis (voor vloeistoffen die niet al te visceus zijn)

DIN 53217 Proeven voor verven, vernissen en soortgelijke produkten; bepaling van de dichtheid met behulp van een pyknometer

DIN 51757 Punt 7 : Proeven voor minerale oliën en verwante materialen; bepaling van de dichtheid

ASTM D 297 Hoofdstuk 15 : Rubberprodukten-chemische analyse

ASTM D 2111 Methode C : Organische halogeenvbindingen

BS 4699 Methode voor het bepalen van soortelijk gewicht en dichtheid van aardolieprodukten (met behulp van een bicapillaire pyknometer met schaalverdeling)

BS 5903 Methode voor het bepalen van de relatieve dichtheid en dichtheid van aardolieprodukten met behulp van een pyknometer met capillaire stop

NF T 20-053 Chemische produkten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen in poeders en vloeistoffen — Pyknometermethode

2.2. Voor vaste stoffen.

ISO 1183 Methode B : Methode voor het bepalen van de dichtheid en relatieve dichtheid van kunststoffen, met uitzondering van schuimplastics

NF T 20-053 Chemische produkten voor industrieel gebruik — Bepaling van dichtheid van vaste stoffen in poeder en vloeistoffen — Pyknometermethode

DIN 19683 Bepaling van de bodemdichtheid

3. VERGELIJKINGSPYKNOMETER MET LUCHT

DIN 55990 Deel 3 : Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte

DIN 53243 Anstrichstoffe; chlorhaltige Polymere; Prüfung

A.4. DAMSPANNING**1. METHODE**

De meeste van de beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in referenties (2) en (3).

1.1. INLEIDING

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuur, de smelttemperatuur en de kooktemperatuur van de stof.

Er bestaat geen meetmethode die voor alle mogelijke waarden van de dampspanning van toepassing is. Er worden daarom verschillende methoden aanbevolen voor het meten van de dampspanning van $< 10^{-4}$ tot 10^5 Pa.

In de regel zal de dampspanning door verontreinigingen worden beïnvloed; de mate van beïnvloeding is sterk afhankelijk van de soort verontreiniging.

Indien er vluchtige verontreinigingen in het monster voorkomen, die het resultaat zouden kunnen beïnvloeden, kan het monster gezuiverd worden. Het kan tevens nuttig zijn om de dampdruk op te geven van technisch zuiver materiaal.

Bij sommige van de hier beschreven methoden gebruikt men apparaten met metalen onderdelen; bij het testen van corrosieve stoffen dient hiermee rekening gehouden te worden.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De dampspanning van een stof wordt gedefinieerd als de druk van de damp van die stof bij verzadiging boven een vaste stof of vloeistof. Bij thermodynamisch evenwicht is de dampspanning van een zuivere stof alleen een functie van temperatuur.

De SI-eenheid van druk die moet worden gebruikt, is de pascal (Pa).

Enkele tot nu toe gebruikte eenheden en hun omrekeningsfactoren zijn:

1 torr (= 1 mm Hg)	= 1,333 × 10 ² Pa
1 atmosfeer	= 1,013 × 10 ⁵ Pa
1 bar	= 10 ⁵ Pa.

De SI-eenheid van temperatuur is de kelvin (K).

De universele molaire gasconstante R is 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹.

De temperatuurafhankelijkheid van de dampdruk wordt beschreven met de vergelijking van Clausius-Clapeyron:

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

waarin:

p = de dampspanning van de stof in pascal (Pa)

ΔH_v = de verdampingswarmte in J mol⁻¹

R = de universele molaire gasconstante in J mol⁻¹ K⁻¹

T = de thermodynamische temperatuur in K.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Voor het bepalen van de dampspanning worden zeven methoden voorgesteld die in verschillende meetbereiken van de dampspanning kunnen worden toegepast. In elke methode wordt de dampspanning bepaald bij verschillende temperaturen. Binnen een beperkt temperatuurbereik is de logaritme van de dampspanning van een zuivere stof een lineaire functie van de reciproke waarde van de temperatuur.

1.4.1. Dynamische methode

In de dynamische methode wordt de kooktemperatuur bij een bepaalde druk gemeten.

Aanbevolen meetbereik : van 10³ Pa tot 10⁵ Pa.

Deze methode wordt ook aanbevolen voor de bepaling van de normale kooktemperatuur en is voor dat doel bruikbaar tot 600 K.

1.4.2. Statische methode

In de statische methode wordt de dampspanning bij thermodynamisch evenwicht in een afgesloten systeem bepaald bij een bepaalde temperatuur. Deze methode is geschikt voor vaste stoffen en vloeistoffen bestaande uit een of meer componenten.

Aanbevolen meetbereik : van 10 Pa tot 10⁵ Pa.

Deze methode kan ook worden gebruikt in het bereik van 1 tot 10 Pa mits voorzichtigheid in acht wordt genomen.

1.4.3. Isoteniscoop

Deze genormaliseerde methode is ook een statische methode, maar is in het algemeen niet geschikt voor systemen met meerdere componenten. Meer gegevens zijn beschikbaar in ASTM-methode D-2879-86.

Aanbevolen meetbereik : van 100 Pa tot 10⁵ Pa.

1.4.4. Effusiemethode : Dampspanningsbalans

De hoeveelheid stof die een cel per tijdseenheid verlaat door een opening met bekende afmetingen, wordt bepaald onder vacuümomstandigheden, waarbij terugkeer van de stof naar de cel verwaarloosbaar is (bij voorbeeld door meting van de kracht welke door een dampstroom op een gevoelige balans wordt uitgeoefend of door meting van de afname van het gewicht).

Aanbevolen meetbereik : van 10⁻³ Pa tot 1 Pa.

1.4.5. Effusiemethode : Door middel van afname van gewicht of met dampval

Deze methode berust op een bepaling van de massa van de te onderzoeken stof die per tijdseenheid in de vorm van damp door een gekalibreerde micro-opening uit een Knudsencel (4) stroomt, in ultra-vacuüm toestand. De hoeveelheid uitgestroomde dampmassa kan verkregen worden door bepaling van de afname van de massa van de cel, of door condensatie van de damp bij lage temperatuur en bepaling van de hoeveelheid verdampende stof met behulp van chromatografische analyse. De dampspanning wordt berekend door toepassing van de Hertz-Knudsen-vergelijking.

Aanbevolen meetbereik : van 10⁻³ Pa tot 1 Pa.

1.4.6. Gasverzadigingsmethode

Een stroom inert dragergas wordt over de stof geleid, zodat het gas verzadigd wordt met de damp van de stof. De hoeveelheid stof die door een bekende hoeveelheid dragergas is getransporteerd, kan gemeten worden door de damp in een geschikte val op te vangen, of door een in serie gekoppelde analytische techniek. Deze hoeveelheid wordt vervolgens gebruikt om de dampspanning bij een gegeven temperatuur te berekenen.

Aanbevolen meetbereik : van 10^{-4} Pa tot 1 Pa.

Deze methode kan ook worden gebruikt in het bereik van 1 tot 10 Pa mits voorzichtigheid in acht wordt genomen.

1.4.7. Draaiende rotor

In de draaiende rotor bestaat het eigenlijke meetelement uit een in een magnetisch veld zwevend klein stalen kogeltje dat met hoge snelheid ronddraait. De gasdruk wordt afgeleid uit de drukafhankelijke snelheidsvermindering van het stalen kogeltje.

Aanbevolen meetbereik : van 10^{-4} Pa tot 0,5 Pa.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De verschillende methoden voor het bepalen van de dampspanning worden in de tabel vergeleken op toepasbaarheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, meetbereik en bestaande normalisatie.

TABEL: KWALITEITSCRITERIA

Meetmethode	Stoffen		Geschatte herhaalbaarheid (1)	Geschatte reproduceerbaarheid (1)	Aanbevolen bereik	Bestaande norm
	Vast	Vloeibaar				
1.4.1. Dynamische methode	Bij lage r° smeltend	Ja	Tot 25%	Tot 25%	10^3 Pa tot 2×10^3 Pa	—
			1-5%	1-5%	2×10^3 Pa tot 10^5 Pa	—
1.4.2. Statische methode	Ja	Ja	5-10%	5-10%	10 Pa tot 10^5 Pa (2)	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Isoteniscoop	Ja	Ja	5-10%	5-10%	10^2 Pa tot 10^5 Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Effusiemethode: Dampspanningsbalans	Ja	Ja	5-20%	Tot 50%	10^{-3} Pa tot 1 Pa	NFT 20-047(6)
1.4.5. Effusiemethode: Gewichtsafname	Ja	Ja	10-30%	—	10^{-3} Pa tot 1 Pa	—
1.4.6. Gasverzadigingsmethode	Ja	Ja	10-30%	Tot 50%	10^{-4} Pa tot 1 Pa (2)	—
1.4.7. Draaiende-rotor-methode	Ja	Ja	10-20%	—	10^{-4} Pa tot 0,5 Pa	—

(1) Afhankelijk van de zuiverheidsgraad.

(2) Deze methode kan ook gebruikt worden in het bereik van 1 tot 10 Pa mits voorzichtigheid in acht wordt genomen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

1.6.1. Dynamische meting

1.6.1.1. Apparatuur

De meetapparatuur bestaat uit een kookvat met glazen of metalen koeler en voorzieningen voor het meten van temperatuur en het regelen en meten van druk. De meetapparatuur die in figuur 1 is afgebeeld, is van hittebestendig glas en bestaat uit vijf delen :

De grote, gedeeltelijk dubbelwandige buis bestaat uit een glazen slijpstuk, een koeler, een koelvat en een inlaatbuis.

De glazen cilinder met een Cottrell-pomp is gemonteerd in het kookgedeelte van de buis en heeft een ruw oppervlak van gebroken glas om "stoten" tijdens het kookproces te voorkomen.

De temperatuur wordt gemeten met behulp van een geschikte temperatuursensor (bij voorbeeld een weerstandsthermometer of een thermokoppel), doorgevoerd in het apparaat tot op de plaats van het meetpunt (nr. 5, figuur 1) via een goed passende opening (bij voorbeeld geslepen insteekverbinding).

De noodzakelijke aansluitingen met de apparatuur voor het regelen en meten van de druk worden gemaakt.

De bol, die als buffervolume werkt, is verbonden met de meetapparatuur door middel van een capillaire buis.

Het kookvat wordt verwarmd met een verwarmingselement (bij voorbeeld een verwarmingspatroon) dat onderin de glazen apparatuur is aangebracht. De gewenste verwarmingsstroom wordt ingesteld en geregeld door middel van een thermokoppel.

Het vereiste vacuum tussen 10^2 Pa en ongeveer 10^5 Pa wordt aangelegd met een vacuümpomp.

Voor het regelen van druk (meetbereik van ongeveer 10^2 Pa tot 10^5 Pa) en ventilatie wordt een passende kraan voor lucht of stikstoftoevoer gebruikt.

Voor het meten van de druk wordt een manometer gebruikt.

1.6.1.2. Meetprocedure

De dampspanning wordt gemeten door de kooktemperatuur van het monster bij verschillende ingestelde waarden van de druk tussen ongeveer 10^3 Pa en 10^5 Pa te bepalen. Als de temperatuur bij constante druk constant blijft, betekent dit dat de kooktemperatuur is bereikt. Schuimende stoffen kunnen met deze methode niet worden onderzocht.

De te onderzoeken stof wordt in een schoon en droog monstervat gebracht. Indien vaste stoffen niet als poeder beschikbaar zijn, kunnen er problemen ontstaan; deze kunnen echter worden opgelost door de koelwatermantel te verwarmen. Na het vullen wordt de apparatuur bij de flens gasdicht afgesloten en worden de stof en de apparatuur ontgast. Vervolgens wordt de laagst gewenste druk ingesteld en wordt het verwarmingssysteem aangezet. Tegelijkertijd wordt de temperatuurvoeler verbonden met een recorder.

Het evenwicht is bereikt, wanneer bij een constante druk een constante kooktemperatuur kan worden afgelezen. Wees voorzichtig om "stoten" tijdens het koken te voorkomen. Voorts moet volledige condensatie plaatsvinden op de koeler. Bij het bepalen van de dampspanning van bij lage temperatuur smeltende stoffen moet men voorkomen dat de condensor verstopt raakt.

Nadat dit evenwichtspunt is geregistreerd, wordt een hogere druk ingesteld. Dit proces wordt herhaald totdat een druk van 10^5 Pa is bereikt (ongeveer 5 tot 10 meetpunten in totaal). Ter controle moeten de evenwichtspunten nogmaals worden bepaald bij afnemende druk.

1.6.2. Statische methode

1.6.2.1. Apparatuur

De apparatuur omvat een vat voor het monster en een verwarmings- en koelsysteem om de monstertemperatuur in te stellen en te meten. De apparatuur bevat bovendien instrumenten om de druk in te stellen en te meten. Figuren 2a en 2b illustreren de basisbeginselen die hier van toepassing zijn.

De monsterruimte (figuur 2a) is aan één zijde afgesloten door een geschikte hoogvacuümkraan. Aan de andere zijde is een U-vormige buis bevestigd die een geschikte manometervloeistof bevat. Eén uiteinde van de U-vormige buis vertakt naar de vacuümpomp, de stikstofcilinder of de ventilatiekraan, en een manometer.

Een drukventiel met drukaanwijzing kan gebruikt worden in plaats van een U-buis (figuur 2b).

Om de stof op een ingestelde temperatuur te brengen, wordt de monsterruimte met de kraan en de U-vormige buis of drukventiel in een bad gebracht, dat op een constante temperatuur van $\pm 0,2$ K gehouden wordt. De temperatuur wordt aan de buitenkant van de monsterruimte of in het vat zelf gemeten.

Een vacuümpomp met een tegenstroomkoelbuis wordt gebruikt om het apparaat vacuüm te zuigen.

Bij methode 2a wordt de dampspanning van de stof indirect gemeten met een nulaanwijzer. Deze methode berust op het feit dat de dichtheid van de vloeistof in de U-buis verandert als de temperatuur sterk wisselt.

Voor de nulpuntsinstelling kunnen in de U-vormige buis, afhankelijk van het drukbereik en het chemisch gedrag van de stof, verschillende vloeistoffen worden gebruikt: siliconenoliën, ftalaten. De teststof mag niet merkbaar oplossen in of reageren met de vloeistof in de U-buis.

Voor de manometer kan kwik worden gebruikt in het bereik van normale luchtdrukken tot 10^2 Pa; siliconenvloeistoffen en ftalaten zijn geschikt voor drukken van 10 tot 10^2 Pa. De verwarmbare membraan capaciteitsmanometers kunnen zelfs worden gebruikt bij drukken beneden 10^{-1} Pa. Er bestaan ook andere drukmeters die gebruikt kunnen worden tot 10^2 Pa.

1.6.2.2. Meetprocedure

Vóór de meting moeten alle onderdelen van de apparatuur in figuur 2 grondig gereinigd en gedroogd worden.

Vul voor methode 2a de U-buis met de gewenste vloeistof die moet zijn ontgast bij verhoogde temperatuur voordat tot aflezen wordt overgegaan.

De te onderzoeken stof wordt in het apparaat geplaatst waarna dit wordt gesloten en vervolgens de temperatuur voldoende wordt verlaagd voor ontgassing. De temperatuur moet laag genoeg zijn om te verzekeren dat alle lucht afgepompt is, maar mag — in geval van een meercomponentensysteem — de samenstelling van het materiaal niet veranderen. Indien gewenst kan een evenwichtstoestand sneller bereikt worden door te roeren.

Het monster kan onderkoeld worden met bij voorbeeld vloeibare stikstof (opgelet: vermijd condensatie van lucht of pompvloeistof) of een mengsel van ethanol en droog ijs. Voor metingen bij lage temperatuur gebruikt men een bad met regelbare temperatuur, dat is aangesloten op een ultrastaat.

Met de kraan boven de monsterruimte in geopende stand wordt vervolgens de ingesloten lucht gedurende een aantal minuten uit de apparatuur gepompt. Daarna wordt de kraan gesloten en de temperatuur van het monster op het laagst gewenste niveau gebracht. Zo nodig moet de ontgassing verschillende keren herhaald worden.

Als het monster verhit wordt, stijgt de dampspanning. Dit verandert het evenwicht van de vloeistof in de U-buis. Om hiervoor te compenseren, wordt stikstof of lucht via de kraan in het apparaat binnengelaten tot de vloeistof in de drukmeter weer bij nul staat. De hiervoor vereiste druk kan afgelezen worden bij kamertemperatuur op een precisie manometer. Deze druk komt overeen met de dampspanning van de te onderzoeken stof bij die specifieke meettemperatuur.

Methode 2b is gelijkaardig, maar de dampspanning wordt direct afgelezen.

De temperatuurafhankelijkheid van de dampspanning wordt bepaald met voldoende kleine temperatuurintervallen (ongeveer 5 tot 10 meetpunten in totaal) tot aan het gewenste maximum. Ter controle moeten de metingen bij lage temperaturen herhaald worden.

Als de waarden die verkregen worden bij de herhaalde metingen niet overeenkomen met de curve verkregen bij stijgende temperatuur, kan dit te wijten zijn aan een van de volgende factoren:

1. Het monster bevat nog altijd lucht (bij voorbeeld stoffen met hoge viscositeit) of bij lage temperatuur kokende stoffen die vrijkomt/vrijkomen bij verwarming en verwijderd kan/kunnen worden door afpompen na verdere onderkoeling.
2. De koeltemperatuur is niet laag genoeg. In dit geval wordt vloeibaar stikstof gebruikt als koelmiddel. Als 1 of 2 van toepassing is dienen de metingen herhaald te worden.
3. De stof ondergaat een chemische reactie in het onderzochte temperatuurbereik (bij voorbeeld afbraak, polymerisatie).

1.6.3. Isoteniscoop

Zie referentie 7 voor een volledige beschrijving van deze methode. Het principe van het meetinstrument is afgebeeld in figuur 3. Evenals de statische methode, die is beschreven in 1.6.2, is de isoteniscoop geschikt voor onderzoek van vaste stoffen en vloeistoffen.

Voor vloeistoffen dient de stof zelf als vulvloeistof in de hulpmanometer. Een hoeveelheid vloeistof die voldoende is voor het vullen van de bol en de korte arm van het manometergedeelte, wordt in de isoteniscoop gebracht. De isoteniscoop wordt met het vacuümsysteem verbonden, leeggepompt en daarna gevuld met stikstof. Het leegmaken en doorspoelen van het systeem wordt tweemaal herhaald om de resterende zuurstof te verwijderen. De gevulde isoteniscoop wordt horizontaal gehouden zodat het monster zich in een dunne laag verspreidt over de bol en het manometergedeelte (U-deel). De druk in het systeem wordt gereduceerd tot 133 Pa en het monster wordt zachtjes verwarmd tot het juist kookt (verwijdering van opgeloste gefixeerde gassen). De isoteniscoop wordt dan zo gedraaid dat het monster terugloopt naar de bol en de korte arm van de manometer, zo dat beide volledig gevuld zijn met vloeistof. De druk wordt aangehouden zoals bij het ontgassen en de uitgetrokken punt van de monsterbol wordt verwarmd met een kleine vlam, totdat de damp die uit het monster vrijkomt voldoende expandeert om een deel van het monster uit het bovenste gedeelte van de bol en de manometerarm te verplaatsen naar het manometergedeelte van de isoteniscoop en zo een met damp gevulde, stikstofvrije ruimte te creëren.

Vervolgens wordt de isoteniscoop in een thermostatisch bad geplaatst, en de druk van de stikstof aangepast tot deze druk gelijk is aan de druk van het monster. Het drukevenwicht wordt aangeduid door het manometergedeelte van de isoteniscoop. Bij het evenwichtspunt is de dampspanning van de stikstof gelijk aan de dampspanning van de te onderzoeken stof.

Voor vaste stoffen worden de in 1.6.2.1 genoemde manometervloeistoffen gebruikt, afhankelijk van het druk- en temperatuurbereik. De ontgaste manometervloeistof wordt in de ronding van de lange arm van de isoteniscoop gebracht. Daarna wordt de te onderzoeken vaste stof in de bol gebracht en bij hogere temperatuur ontgast. Vervolgens

wordt de isoteniscoop gekanteld zodat de manometervloeistof in de U-buis kan stromen. Het meten van de dampspanning als functie van de temperatuur vindt plaats volgens 1.6.2.

1.6.4. Effusiemethode : Dampspanningsbalans

1.6.4.1. Apparatuur

In de literatuur worden verschillende versies van het apparaat beschreven (1). Het hier beschreven apparaat illustreert de algemene basisprincipes (figuur 4). De belangrijkste onderdelen zijn afgebeeld in figuur 4; deze bestaan uit een hoogvacuüm roestvrijstalen of glazen houder, apparatuur om een vacuüm te creëren en te meten, alsmede ingebouwde onderdelen voor het meten van de dampspanning door middel van een balans. De volgende onderdelen zijn in het apparaat gemonteerd :

— Een verdampingsoven met een flens en een draaiende inlaat. De verdampingsoven is een cilindervormig vat, vervaardigd uit bijvoorbeeld koper of een chemisch inerte, thermische goed geleidende legering. Een glazen vat omgeven door een koperen wand kan ook gebruikt worden. De oven heeft een diameter van ongeveer 3 tot 5 cm en is 2 tot 5 cm hoog. Er zijn één tot drie openingen van verschillende grootte voor de dampstroom. De oven wordt verwarmd met behulp van of wel een verwarmingsplaat onder de oven, of wel een verwarmingsspiraal rond de buitenkant van de oven. Om te voorkomen dat de warmte zich verspreidt over de grondplaat wordt de verwarming verbonden met de grondplaat via een metalen stuk met lage thermische geleiding (nikkel-zilver- of chroom-nikkelstaal), bij voorbeeld een nikkel-zilverbuis verbonden met de draaibare inlaat in het geval van een oven met verschillende openingen. Deze opstelling heeft als voordeel dat er een koperen staaf ingebracht kan worden. Zo kan er van buitenuit gekoeld worden met behulp van een koelbad.

— Als het ovendeksel drie openingen van verschillende doorsnede heeft, welke 90° ten opzichte van elkaar zijn geplaatst, kunnen verschillende dampspanningen in het totale te meten bereik worden gemeten (openingen tussen ongeveer 0,30 en 4,50 mm doorsnede). Grote openingen dienen voor lage dampdrukken en vice versa. Door de oven te draaien kan de gewenste opening of een tussenstand voor de dampstroom (ovenopening — schild — balansschaal) worden ingesteld waardoor de molecuulstroom door de ovenopening op of naast de balansschaal wordt gericht. Om de temperatuur van de stof te meten, is een thermokoppel of weerstandsthermometer op een geschikte plaats gemonteerd.

— Boven het schild hangt de balansschaal van een zeer gevoelige microbalans (zie verder). De balansschaal heeft een diameter van ongeveer 30 mm. Verguld aluminium is een geschikt materiaal.

— De balansschaal wordt omgeven door een cilindervormige koelpot van messing of koper. Afhankelijk van het type heeft de balans een opening voor de balansarm en een schildopening voor de molecuulstroom, zodat totale condensatie van de damp op de balansschaal wordt verzekerd. De warmteafvoer naar buiten vindt plaats door een koperen staaf naar de koeling. Deze wordt door de grondplaat geleid en is daarvan thermisch geïsoleerd, bij voorbeeld met een chroom-nikkelstalen buis. De staaf wordt onder de grondplaat in een dewarvat met vloeibare stikstof gedompeld of men laat vloeibare stikstof door de staaf stromen. De koelpot wordt zo op een temperatuur van ongeveer - 120 °C gehouden. De balansschaal wordt uitsluitend door straling gekoeld, voldoende voor het onderzochte drukbereik (koeling ongeveer een uur vóór het begin van de meting).

— De balans wordt boven de koelpot geplaatst. Geschikte balansen zijn bij voorbeeld een zeer gevoelige 2-armige elektronische microbalans (8) of een zeer gevoelig instrument met bewegende spiraal (zie OESO Test Guideline 104, uitgave 12.05.81).

— De grondplaat bevat bovendien elektrische aansluitingen voor thermokoppels (of weerstandsthermometers) en verwarmingsspiralen.

— In het vat wordt een vacuüm geproduceerd met behulp van een partiële vacuümpomp of een hoogvacuümpomp (vereist vacuüm van ongeveer 1 tot 2 x 10⁻³ Pa, verkregen na 2 uur pompen). De druk wordt geregeld met een geschikte ionisatiemanometer.

1.6.4.2. Meetprocedure

Het vat wordt gevuld met de te onderzoeken stof en het deksel wordt gesloten. Het schild en de koelpot worden boven de oven geschoven. Het apparaat wordt gesloten en de vacuümpompen worden ingeschakeld. De einddruk vóór het begin van de meting is ongeveer 10⁻⁴ Pa. Vanaf 10⁻² Pa wordt de koelpot aangezet.

Wanneer het benodigde vacuüm is bereikt, kan de ijkserie bij de laagst gewenste temperatuur worden gestart. De overeenkomstige opening in het deksel wordt ingesteld, de damp stroomt door het schild recht boven de opening en raakt de gekoelde balansschaal. De balansschaal moet groot genoeg zijn om te verzekeren dat hij wordt geraakt door de volledige dampstroom die door de opening in het schild geleid wordt. De impuls van de dampstroom werkt als kracht op de balansschaal en de moleculen condenseren op het gekoelde oppervlak.

De impuls en gelijktijdige condensatie veroorzaken een signaal op de recorder. Dit signaal kan op twee manieren worden beoordeeld :

1. Voor het hier beschreven apparaat wordt de dampspanning direct bepaald uit de impuls op de schaal (hiervoor hoeft de molecuulmassa niet bekend te zijn (2)). Er dient wel rekening gehouden te worden met geometrische factoren zoals de ovenopening en de hoek van de molecuulstroom bij het verwerken van de metingen.

2. Tegelijkertijd kan de massa van het condensaat worden gemeten zodat de verdampingssnelheid hieruit kan worden berekend. De dampspanning kan ook worden berekend uit de verdampingssnelheid en de molecuulmassa door gebruik te maken van de vergelijking van Herz (2) :

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

waarin :

G = verdampingssnelheid (kg s⁻¹m⁻²)

M = molaire massa (g mol⁻¹)

T = temperatuur (K)

R = universele molaire gasconstante (J mol⁻¹ K⁻¹)

p = dampspanning (Pa).

Als het vereiste vacuüm is bereikt, wordt begonnen met de serie metingen bij de laagst gewenste meettemperatuur.

Voor verdere metingen wordt de temperatuur met kleine stappen verhoogd, totdat de hoogste gewenste temperatuur bereikt wordt. Vervolgens wordt het monster weer afgekoeld en eventueel wordt een tweede kromme van de dampspanning gemeten. Als de tweede reeks de resultaten van de eerste niet bevestigt, dan is het mogelijk dat de stof in het gemeten temperatuurbereik ontleedt.

1.6.5. Effusiemethode : Door middel van gewichtsafname

1.6.5.1. Apparatuur

Het uitstroomapparaat bestaat uit de volgende basisonderdelen :

- een tank die van een thermostaatregeling voorzien kan worden en waarin de effusiecellen zijn geplaatst;
- een hoogvacuümpomp (bij voorbeeld een diffusiepompe of een turbomoleculaire pompe) met vacuümmeter;
- een val met gebruik van vloeibaar stikstof of droog ijs.

In figuur 5 wordt een elektrisch verwarmde aluminium vacuümtank met 4 roestvrijstalen uitstroomcellen als voorbeeld afgebeeld. De roestvrijstalen folie van ongeveer 0,3 mm dikte heeft een uitstroomopening van 0,2 tot 1,0 mm doorsnede en is verbonden met de uitstroomcel via een van schroefdraad voorzien deksel.

1.6.5.2. Meetprocedure

De ijk- en teststoffen worden in elke uitstroomcel gebracht, het metalen diafragma met de opening wordt vastgeschroefd met behulp van het deksel, elke cel wordt gewogen met een nauwkeurigheid van 0,1 mg. De cel wordt in het van een thermostaat voorziene apparaat geplaatst, dat vervolgens wordt afgepompt tot beneden een tiende van de te verwachten druk. Met vaste tussenpozen van 5 tot 30 uur wordt lucht in het apparaat gelaten en de afname van de massa van de uitstroomcel wordt bepaald door een nieuwe weging.

Om zeker te zijn dat de resultaten niet beïnvloed worden door vluchtige verontreinigingen, wordt de cel opnieuw gewogen met vaste tussenpozen om te controleren of de verdampingssnelheid constant blijft over ten minste twee zulke perioden.

De dampspanning p in de uitstroomcel wordt gegeven door :

$$p = \frac{m}{KA_t} \sqrt{\frac{2 \pi R T}{M}}$$

waarin:

p = dampspanning (Pa)

m = massa van de stof die de cel verlaat tijdens tijd t (kg)

t = tijd (s)

A = oppervlakte van de opening (m^2)

K = correctiefactor

R = universele gasconstante ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatuur (K)

M = molecuulmassa (kg mol^{-1}).

De correctiefactor K is afhankelijk van de verhouding van de lengte tot de straal van de cilindrische opening:

verhouding:	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K :	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

De bovenstaande vergelijking kan ook geschreven worden als:

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

waarin $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2 \pi R}$ de uitstroomcelconstante is.

Deze effusiecelconstante E kan bepaald worden met behulp van ijkstoffen (2,9) via de volgende vergelijking:

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

waarin:

$p(r)$ = dampspanning van de ijkstof (Pa)

$M(r)$ = molecuulmassa van de ijkstof (kg mol^{-1}).

1.6.6. Gasverzadigingsmethode

1.6.6.1. Apparatuur

De apparatuur voor deze test bestaat uit de onderdelen zoals afgebeeld in figuur 6a en zoals hieronder beschreven (1).

Inert gas :

Het dragergas mag niet chemisch met de te onderzoeken stof reageren. Stikstof voldoet meestal, maar in een enkel geval kan een ander gas nodig zijn (10). Het gebruikte gas moet droog en schoon zijn (zie figuur 6a, onderdeel 4 : relatieve vochtigheidsmeter).

Regeling van de gasstroom :

Voor het instellen van een constante gasstroom door de verzadigingskolom is een gasregelingsysteem nodig.

Dampvallen :

De keuze van het type dampval hangt af van de eigenschappen van het monster en de gekozen analysemethode. De damp moet kwantitatief worden opgevangen in een vorm waarin vervolgens analyse mogelijk is. Voor sommige stoffen zullen dampvallen met een vloeistof zoals hexaan of ethyleenglycol geschikt zijn. Voor andere stoffen zijn vaste adsorbentia meer geschikt.

Als een alternatief voor dampvallen met daarop volgende analyse kunnen in serie gezette analytische technieken zoals chromatografie gebruikt worden om de hoeveelheid stof, die door een bekende hoeveelheid dragergas wordt verplaatst, te meten. Verder kan ook het massaverlies van het monster gemeten worden.

Warmtewisselaar :

Voor metingen bij verschillende temperaturen kan het noodzakelijk zijn om een warmtewisselaar in de opstelling aan te brengen.

Verzadigingskolom :

De te onderzoeken stof wordt, vanuit een oplossing, op een geschikte inerte drager gebracht. De aldus beladen drager wordt in een verzadigingskolom gebracht; de afmetingen van de kolom en de stroomsnelheid van het dragergas moeten een volledige verzadiging van het dragergas verzekeren. De verzadigingskolom moet zijn voorzien van een thermostaatregeling. Voor metingen boven kamertemperatuur moet het gedeelte tussen de verzadigingskolom en de dampvallen worden verwarmd om te voorkomen dat de te onderzoeken stof daar condenseert.

Om het verplaatsen van de stofmassa door diffusie te verminderen, kan een capillair achter de verzadigingskolom geplaatst worden (figuur 6b).

*1.6.6.2. Meetprocedure**Bereiding van de verzadigingskolom :*

Een oplossing van de te onderzoeken stof in een zeer vluchtig oplosmiddel wordt toegevoegd aan een geschikte hoeveelheid dragermateriaal. Er moet voldoende te onderzoeken stof worden toegevoegd om gedurende de gehele proef verzadiging te verzekeren. Het oplosmiddel wordt volledig afgedampt aan de lucht of in een roterende verdamper, waarna het grondig gemengde materiaal in de verzadigingskolom wordt gebracht. Nadat het monster op de gewenste temperatuur is gebracht, wordt droge stikstof door de apparatuur geleid.

Meting :

De dampvallen of in serie geplaatste detectors worden verbonden met de uitstroombuis van de kolom en de tijd wordt geregistreerd. De stroomsnelheid wordt aan het begin en op gezette tijden gedurende het experiment gecontroleerd met behulp van een bellenteller (of continu met een massastroommeter).

De druk bij de uitgang van de verzadigingskolom moet worden gemeten :

(a) ofwel door een manometer tussen de verzadigingskolom en de dampvallen te plaatsen (dit kan onbevredigend zijn vanwege de vergroting van de dode ruimte en het adsorberende oppervlak),

(b) ofwel door in een afzonderlijk experiment de drukvervalen over het gebruikte opvangsysteem te bepalen als functie van de stroomsnelheid (dit kan onbevredigend zijn bij gebruik van vloeistofvallen).

De tijd die nodig is om de voor de verschillende analysemethoden vereiste hoeveelheid stof op te vangen, wordt bepaald aan de hand van inleidende proeven of schattingen. Als alternatief voor het opvangen van de stof voor verdere analyse kan een in serie gekoppelde kwantitatieve analytische techniek gebruikt worden (bij voorbeeld chromatografie). Voordat de dampdruk bij een bepaalde temperatuur wordt berekend, moeten inleidende proeven worden uitgevoerd om de maximale stroomsnelheid te bepalen waarbij het dragergas volledig verzadigd zal worden met de damp van de te onderzoeken stof. Dit is het geval als het dragergas zo langzaam door de verzadiger wordt geleid, dat een nog geringere snelheid geen grotere berekende dampdruk geeft.

De te gebruiken analysemethode (bij voorbeeld gaschromatografie of gravimetrie) hangt af van de aard van de te onderzoeken stof.

De hoeveelheid stof, die door een bekend volume dragergas wordt getransporteerd, wordt bepaald.

1.6.6.3. Berekening van de dampspanning

De dampspanning wordt berekend uit de dampdichtheid, W/V , met behulp van de vergelijking :

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

waarin:

p = dampspanning (Pa)

W = massa van de verdampde teststof (kg)

V = volume verzadigd gas (m^3)

R = universele molaire gasconstante ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = temperatuur (K)

M = molaire massa van de teststof ($kg \text{ mol}^{-1}$).

De gemeten volumes moeten worden gecorrigeerd voor druk- en temperatuurverschillen tussen de stroomsnelheidsmeter en de verzadigingskolom die met een thermostaat op constante temperatuur gehouden wordt. Als de stroomsnelheidsmeter zich achter de dampval bevindt, kan het nodig zijn te corrigeren voor bestanddelen die uit de vol verdampt zijn (1).

1.6.7. Draaiende rotor (8, 11, 13)

1.6.7.1. Apparatuur

De draaiende rotortechniek kan worden uitgevoerd met behulp van een draaiende-rotor-viscositeitsmeter zoals afgebeeld in figuur 8. Een schematische tekening van de experimentele opstelling wordt getoond in figuur 7.

De meetapparatuur bestaat meestal uit een meetkop met draaiende rotor, geplaatst in een van thermostaatregeling voorziene ruimte (geregeld op 0,1 °C). De monsterhouder wordt in een van een thermostaatregeling voorziene ruimte (geregeld op 0,01 °C) gebracht, en om condensatie te voorkomen, worden alle andere onderdelen van de opstelling op een hogere temperatuur gehouden. Een hoogvacuümpomp wordt aan het toestel verbonden door middel van hoogvacuümkranen.

De meetkop met draaiende rotor bestaat uit een stalen kogel (4 tot 5 mm doorsnede) in een buis. De kogel zweeft stabiel in een magnetisch veld, opgewekt met een combinatie van permanente magneten en controlespoelen.

De kogel wordt aan het draaien gebracht door rotatie van de velden. De rotatiesnelheid kan worden bepaald met meetspoelen, die de altijd aanwezige geringe zijdelingse magnetisatie van de kogel meten.

1.6.7.2. Meetprocedure

Als de kogel een bepaalde draaisnelheid $v(o)$ (gewoonlijk ongeveer 400 toeren per seconde) heeft bereikt, wordt de energietoevoer gestopt waardoor een vertraging van de draaisnelheid optreedt, die het gevolg is van de gaswrijving.

De afname van de rotatiesnelheid wordt gemeten als functie van de tijd. Als de wrijving door de magnetische ophanging verwaarloosd kan worden ten opzichte van de wrijving van het gas, wordt de gasdruk p gegeven door :

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

waarin:

\bar{c} = gemiddelde snelheid van de gasmoleculen

r = straal van de kogel

ρ = soortelijke massa van de kogel

σ = coëfficiënt van de overdracht van het tangentieel moment ($\sigma = 1$ voor een ideaal boloppervlak van de kogel)

t = tijd

$v(t)$ = rotatiesnelheid na tijd t

$v(o)$ = beginrotatiesnelheid.

Deze vergelijking kan ook geschreven worden als:

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

waarin t_n, t_{n-1} de tijd voorstelt die nodig is voor een gegeven aantal omwentelingen N . Deze tijdsintervallen t_n en t_{n-1} volgen elkaar op waarbij $t_n > t_{n-1}$.

De gemiddelde snelheid van het gasmolecuul \bar{c} wordt gegeven door:

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

waarin:

T = temperatuur

R = universele molaire gasconstante

M = molaire massa.

2. GEGEVENS

In elk van de voorafgaande methoden moet de dampspanning ten minste bij twee temperaturen worden bepaald. Bepaling van de dampspanning bij drie of meer temperaturen in het bereik van 0 tot 50 °C verdient de voorkeur, aangezien men dan kan controleren of de dampspanningskromme lineair is.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- de gebruikte methode;
- de nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen) en indien van toepassing, voorafgaande zuivering;
- ten minste twee waarden voor de dampspanning en de bijbehorende temperaturen, bij voorkeur in het bereik van 0 tot 50 °C;
- alle ruwe gegevens;
- grafiek van $\log p$ tegen $1/T$;
- geschatte waarde van de dampspanning bij 20 of 25 °C.

Indien een verandering (faseovergang, ontleding) in de onderzochte stof werd waargenomen, dient het testrapport in het bijzonder de volgende gegevens te bevatten :

- aard van de verandering;
- temperatuur waarbij de verandering optreedt bij atmosferische druk;

— dampspanning bij 10 °C respectievelijk 20 °C beneden de overgangstemperatuur en bij 10 °C respectievelijk 20 °C boven de overgangstemperatuur (tenzij het een overgang is van vaste fase naar gasfase)

Alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof, dienen te worden gerapporteerd.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104. Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Ambrose, D., in B. Le Neindre, B. Vodar (Eds.) : Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol. II.
- (3) R. Weissberger ed. : Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Chapter IX, Interscience Publ., New York, 1959, Vol. 1, Part 1.
- (4) Knudsen, M. : Ann. Phys. Lpz., 1909, Vol. 29, 1979; 1911, Vol. 34, 593.
- (5) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^5 Pa — Static method.
- (6) NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use—Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa — Vapour pressure balance method.
- (7) ASTM D 2879-86. Standard test method for vapour pressure/temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- (8) G. Messer, P. Ruohl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol., (A), 1987, Vol. 5 (4), 2440.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I. J., Sprake, C. H. S. J. Chem. Thermodynamics 1975, Vol. 7, 1173.
- (10) B. F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, Vol. 85, 435.
- (11) G. Comsa, J. K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, Vol. 17 (2), 642.
- (12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, Vol. 20 (4), 1148.
- (13) J. K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol., (A), 1985, Vol. 3 (3), 1715.

Aanhangsel I. — Schattingsmethode

INLEIDING

De berekende waarden van de dampspanning kunnen als volgt worden gebruikt :

- om te bepalen welke van de experimentele methoden geschikt is;
- om een schatting of grenswaarde te verkrijgen, in geval de experimentele methode om technische redenen niet toegepast kan worden (ook als de dampspanning zeer laag is);
- om die gevallen op te kunnen sporen, waar de experimentele meting kan worden weggelaten omdat de dampspanning waarschijnlijk $< 10^{-5}$ Pa zal zijn bij omgevingstemperatuur.

SCHATTINGSMETHODE

De dampspanning van vloeistoffen en vaste stoffen kan geschat worden met behulp van de gewijzigde Correlatie van Watson (a). Het emge benodigde gegeven is de normale kooktemperatuur. De methode is toepasbaar in het drukbereik van 10^5 Pa tot 10^{-5} Pa.

Uitgebreide informatie over deze methode wordt gegeven in het " Handbook of Chemical Property Estimation Methods" (b).

BEREKENINGSPROCEDURE

Volgens (b) wordt de dampspanning als volgt berekend :

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

waarin:

T = de bewuste temperatuur

T_b = normale kooktemperatuur

p_{vp} = dampspanning bij temperatuur T

ΔH_{vh} = verdampingswarmte

ΔZ_b = samendrukbaarheidscoëfficiënt (geschat op 0,97)

m = empirische factor afhankelijk van de fysische toestand bij de bewuste temperatuur.

En verder

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

waarin K_F een empirische factor is die verband houdt met de polariteit van de stof. De K_F -factoren voor verschillende samengestelde stoffen worden gegeven in referentie (b).

Zeer vaak zijn gegevens beschikbaar over de kooktemperatuur bij gereduceerde druk. In deze gevallen wordt, volgens (b), de dampspanning als volgt berekend:

$$\ln p_{vp} \approx \ln p_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[1 - (3 - 2 \frac{T}{T_1})^m \frac{T_1}{T} - 2 m (3 - 2 \frac{T}{T_1})^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right]$$

Hierbij is T_1 het kookpunt bij de gereduceerde druk p_1 .

RAPPORT

Indien de schattingsmethode wordt gebruikt, dient het rapport een uitgebreide beschrijving van de berekening te bevatten.

LITERATUUR

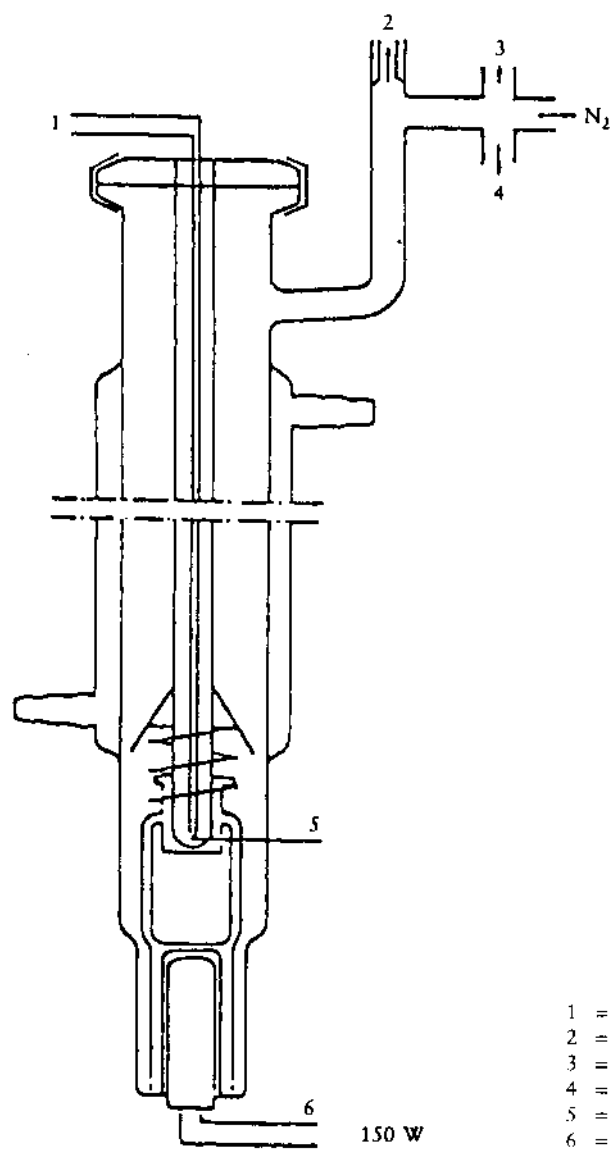
(a) K. M. Watson, Ind. Eng. Chem., 1943, Vol. 35, 398.

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

Aanhangsel 2

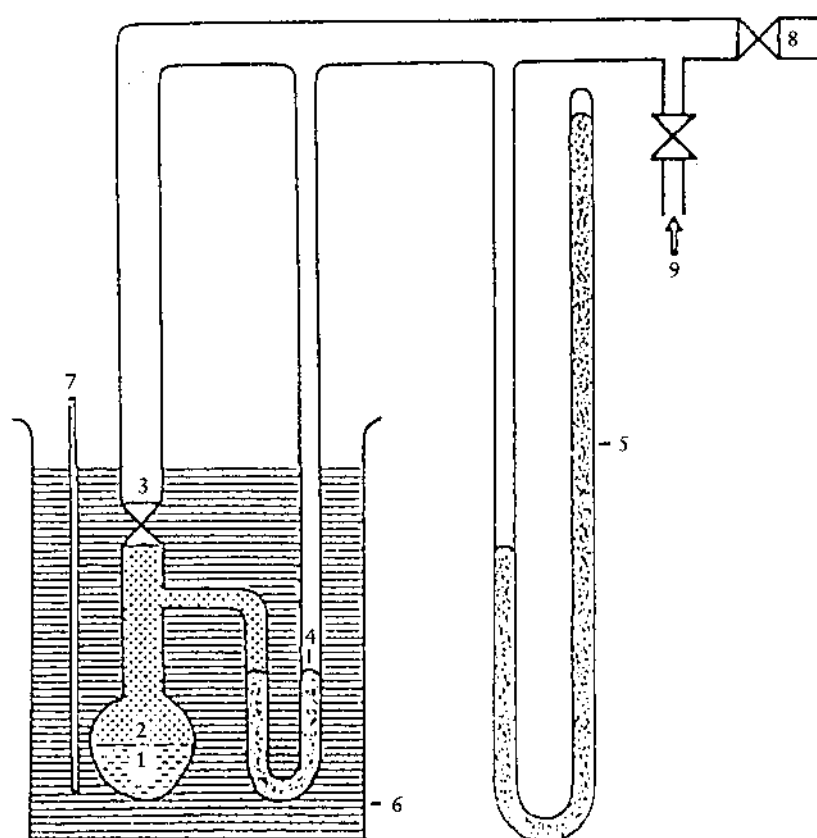
Figuur 1

Apparaat voor bepaling van de dampspanningskromme volgens de dynamische methode



Figuur 2a

Apparaat voor bepaling van de dampspanningskromme volgens de statische methode (gebruik makend van de U-buis manometer)

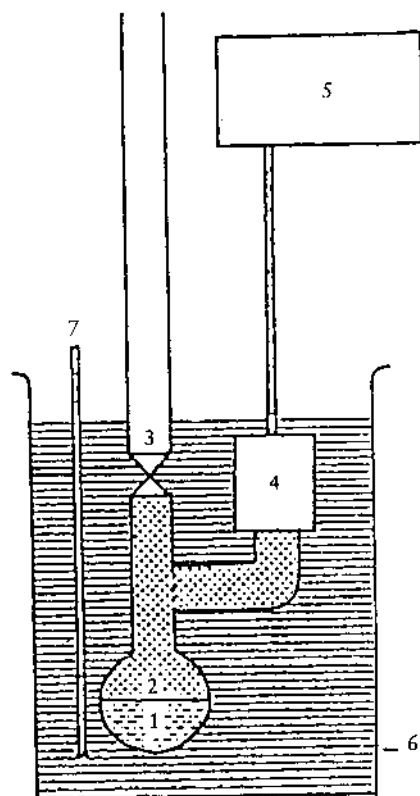


1 = Te onderzoeken stof
2 = Dampfase
3 = Hoogvacuümkraan
4 = U-buis (hulpmanometer)
5 = Manometer

6 = Temperatuurbad
7 = Temperatuurmeetapparaat
8 = Naar de vacuümpomp
9 = Ventilatie

Figuur 2b

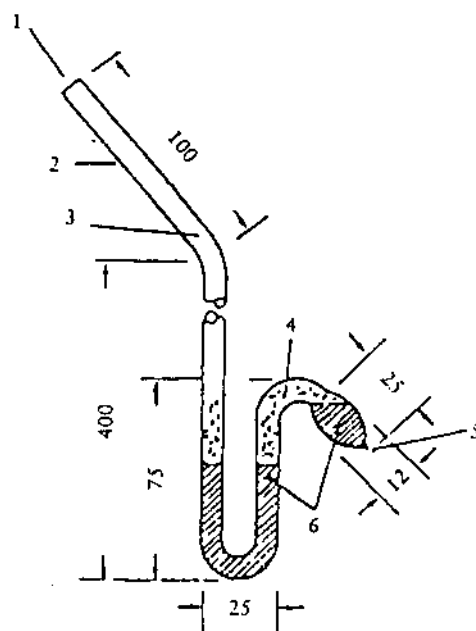
Apparaat voor bepaling van de dampspanningskromme volgens de statische methode (gebruik makend van een drukaanwijzing)



1 = Te onderzoeken stof
2 = Dampfase
3 = Hoogvacuümkraan
4 = Drukventiel

5 = Drukaanwijzer
6 = Temperatuurbad
7 = Temperatuur-meetapparaat

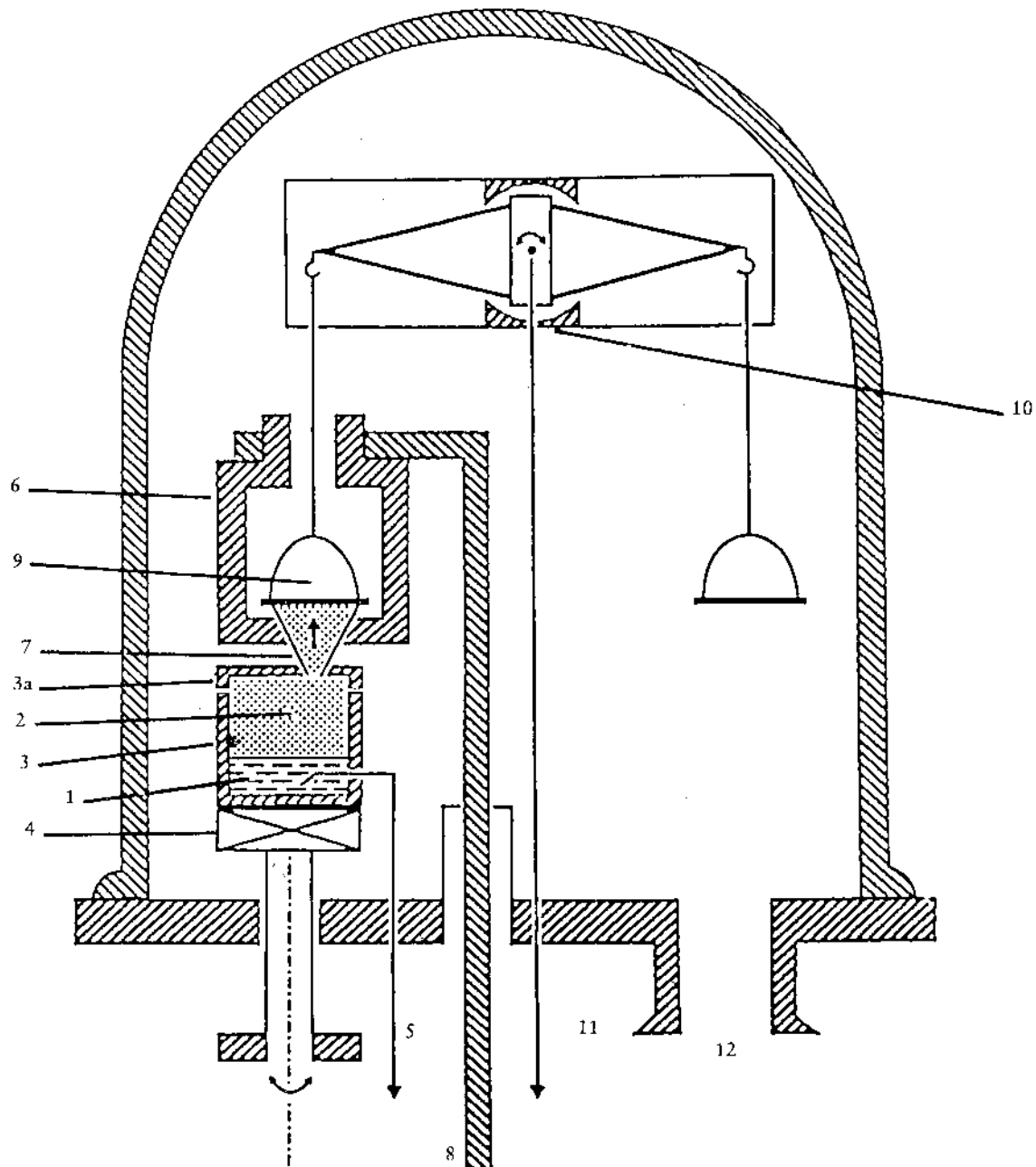
Figuur 3
Isoteniscoop (referentie 2)



- 1 = Naar meet- en regelsysteem voor druk
- 2 = 8 mm uitwendige buis
- 3 = Droge stikstof in druksysteem
- 4 = Damp van het monster
- 5 = Kleine punt
- 6 = Vloeibaar monster

Figuur 4

Apparatuur voor bepaling van de dampspanningskromme met behulp van de dampspanningsbalansmethode

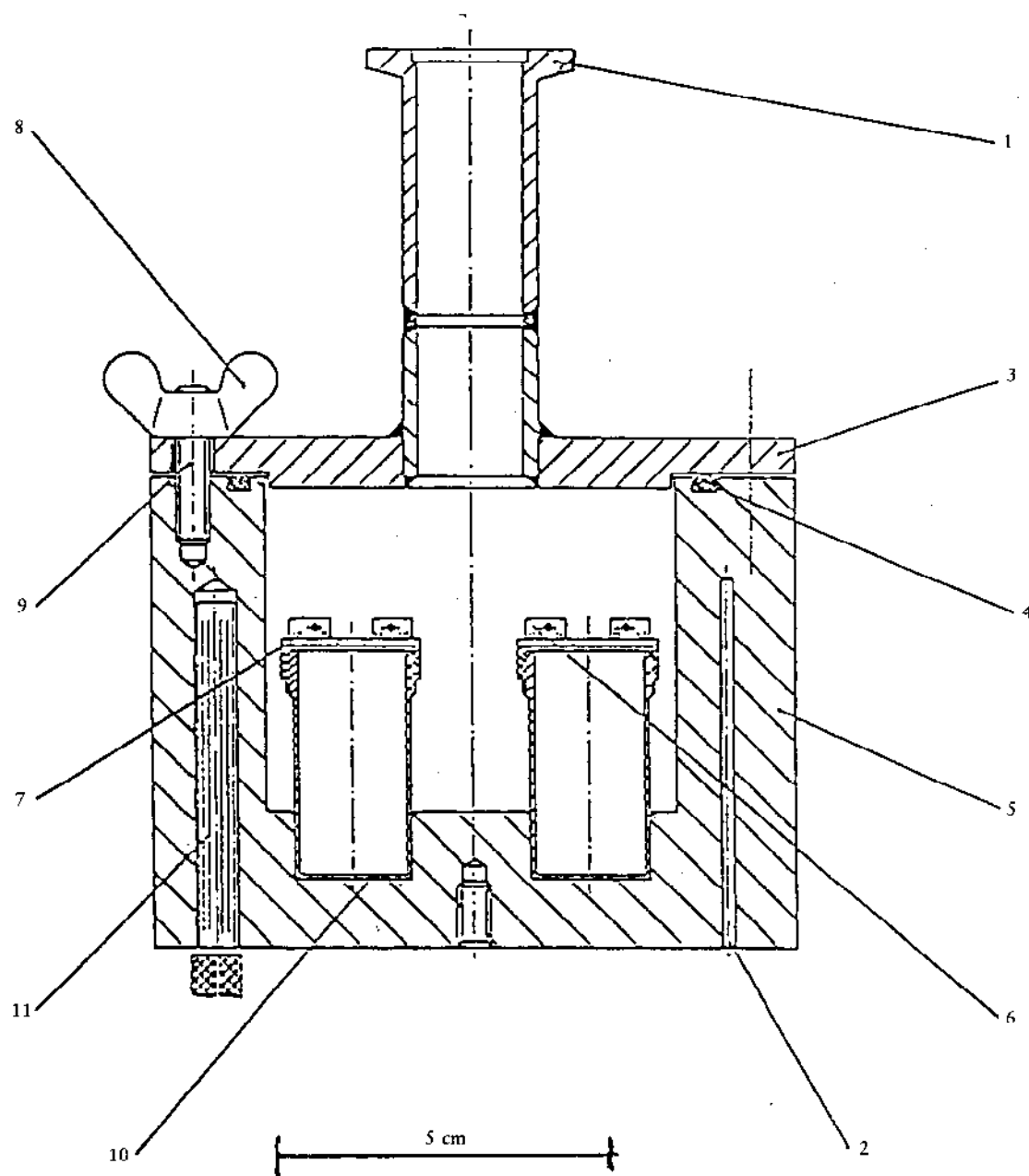


- 1 = Te onderzoeken stof
- 2 = Dampfase met dampstroom
- 3 = Verdampingsoven met draaibare openingen
- 3a = Ovendeksel met opening
- 4 = Ovenverwarming (koelpot)
- 5 = Meting van de temperatuur van het monster

- 6 = Koelsysteem
- 7 = Schild
- 8 = Koelstaaf voor koelsysteem
- 9 = Balanschaal
- 10 = Microbalans
- 11 = Naar de recorder
- 12 = Naar de hoogvacuümpomp

Figuur 5

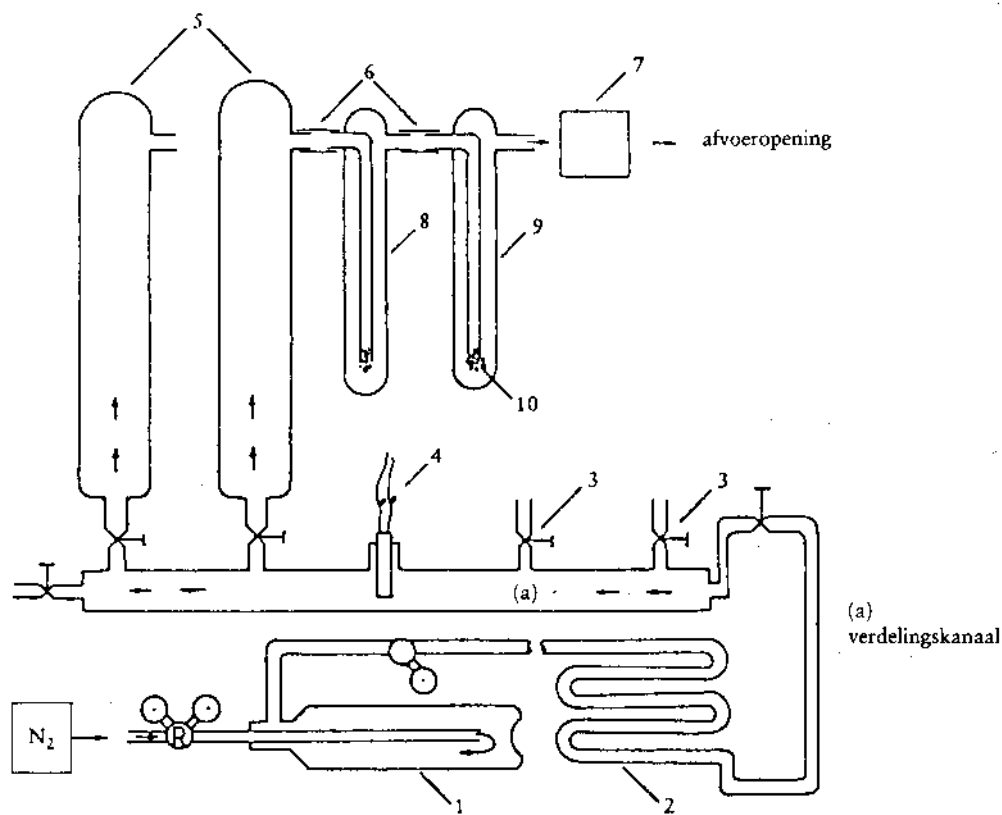
Voorbeeld van een apparaat voor verdamping bij lage druk met behulp van de uitstroommethode, met een uitstroomcelvolume van 8 cm^3



- 1 = Verbinding naar vacuüm
- 2 = Uitsparingen voor platina weerstandsthermometer of temperatuurmeter en -regeling (2)
- 3 = Deksel voor vacuümvat
- 4 = O-ring
- 5 = Aluminium vacuümvat
- 6 = Onderdeel voor het plaatsen en verwijderen van de cellen
- 7 = Deksel met schroefdraad
- 8 = Vleugelmoeren (6)
- 9 = Bouten (6)
- 10 = Roestvrijstalen uitstroomsel
- 11 = Verwarmingspatronen (6)

Figuur 6a

Voorbeeld van een gasstroomstelsel voor bepaling van de dampspanning volgens de gasverzadigingsmethode

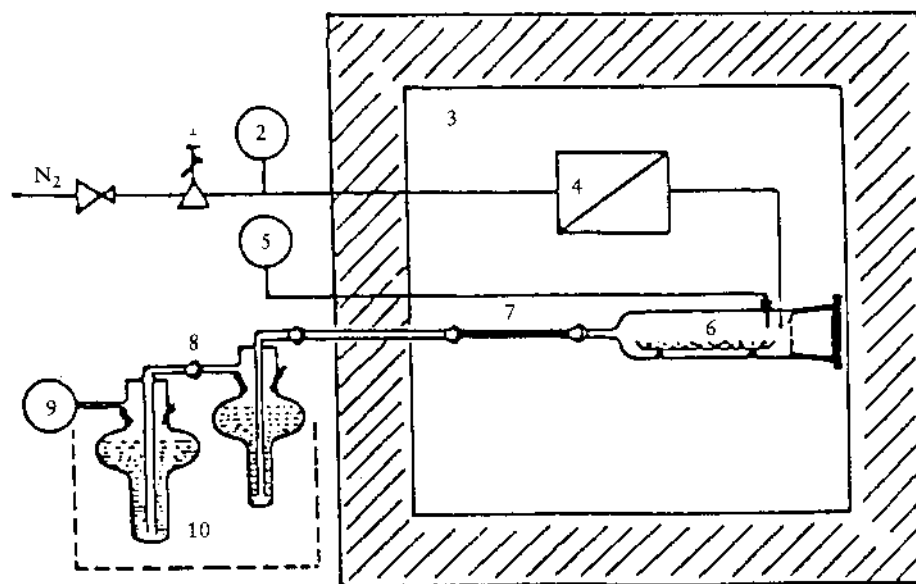


1 = Gasstroomregelaar
 2 = Warmtewisselaars
 3 = Naaldventielen
 4 = Sensor (%) relatieve vochtigheid
 5 = Verzadigingskolommen

6 = PTFE-verbindingstukken
 7 = Gasstroommeter
 8 = Dampval (absorptie)
 9 = Oliveval
 10 = Bellenteller met glasfilter

Figuur 6b

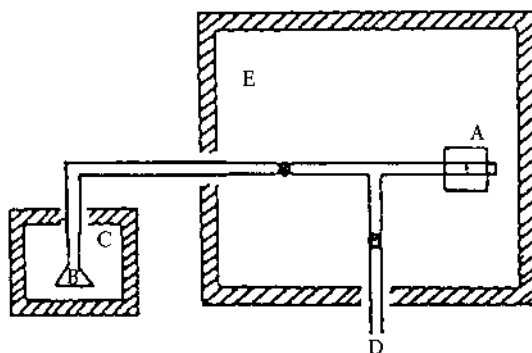
Een voorbeeld van een systeem voor de bepaling van de dampspanning met de gasverzadigingsmethode, met een capillair geplaatst achter de verzadigingskamer



- | | |
|--|--------------------------|
| 1 = Thermische massastroommeter | 6 = Gasverzadigingskamer |
| 2 = Manometer | 7 = Capillair |
| 3 = Thermostatisch geregelde ruimte | 8 = Absorptievaten |
| 4 = Thermostatische spiraal voor dragergas | 9 = Gasmeter |
| 5 = Thermometer (Pt 100) | 10 = Koudeval |

Figuur 7

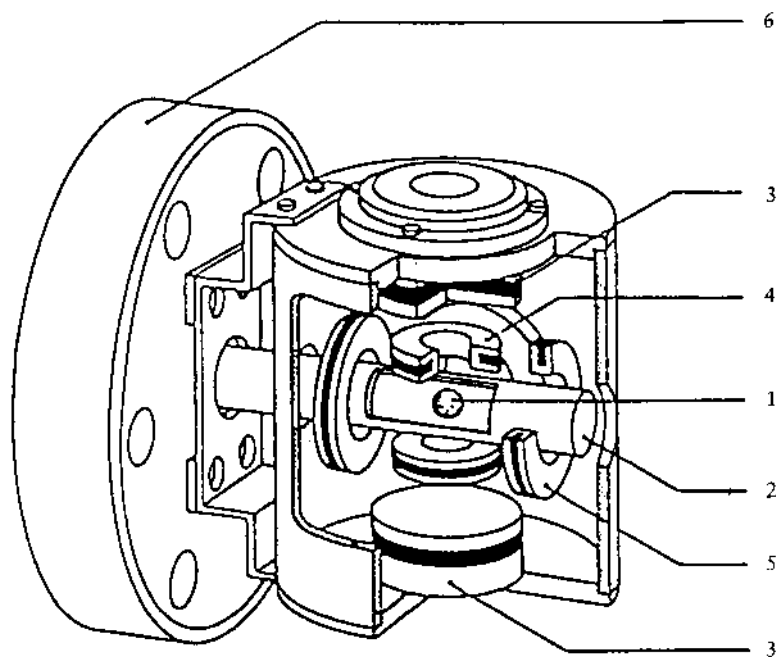
Voorbeeld van experimentele opstelling voor de draaiende-rotormethode



- Dampspanningsapparaat
- | |
|------------------------------|
| A. Draaiende-rotormeeftkop |
| B. Monstercel |
| C. Thermostaat |
| D. Vacuümleiding (turbopomp) |
| E. Luchtthermostaat |

Figuur 8

Voorbeeld van een draaiende-rotormeeetkop



- 1 = Kogel
 2 = Vacuümbuis bevestigd aan 6
 3 = Permanente magneten (2)
 4 = Magneetspoelen (2) voor verticale stabilisatie
 5 = Magneetspoelen voor aandrijving (4)
 6 = Verbindingsflens

A. 5. OPPERVLAKTESPANNING

1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1). De fundamentele principes worden besproken in referentie (2).

1.1. INLEIDING

De hier beschreven methoden zijn geschikt voor de bepaling van de oppervlaktespanning van waterige oplossingen.

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de oplosbaarheid in water, de structuur, de hydrolyseerbaarheid en de kritische concentraties voor de vorming van micellen.

De hieronder beschreven methoden zijn geschikt voor de meeste chemische stoffen, ongeacht de zuiverheid ervan.

Bepaling van de oppervlaktespanning met behulp van de ringspanningsmeter is alleen mogelijk voor waterige oplossingen met een dynamische viscositeit van minder dan ongeveer 200 mPa.s.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De vrije-oppervlakte-enthalpie per oppervlakte-eenheid heet de oppervlaktespanning. De oppervlaktespanning wordt uitgedrukt in N/m (SI-eenheid) of in mN/m (SI-subeenheid).

$$1 \text{ N/m} = 10^3 \text{ dyne/cm}$$

$$1 \text{ mN/m} = 1 \text{ dyne/cm in het verouderde cgs-systeem.}$$

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

Een aantal referentiestoffen met zeer uiteenlopende oppervlaktespanningen staan vermeld in referenties (1) en (3).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

De methoden berusten op de meting van de maximale kracht die verticaal moet worden uitgeoefend op een beugel of een ring die het oppervlak van de te onderzoeken vloeistof in een meetbak raakt, om deze beugel of ring van dit oppervlak te scheiden, of op een plaat waarvan een rand het oppervlak raakt, om de vloeistoflaag die zich heeft gevormd op te trekken.

Stoffen die oplosbaar zijn in water met een concentratie van ten minste 1 mg/l worden getest in waterige oplossingen bij één concentratie.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Deze methoden zijn nauwkeuriger dan waarschijnlijk voor milieubeoordelingsdoeleinden noodzakelijk is.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

De stof wordt opgelost in gedestilleerd water. De concentratie van deze oplossing moet 90 % van die van een verzadigde oplossing in water bedragen. Indien deze concentratie de 1 g/l overschrijdt, wordt een oplossing van 1 g/l gebruikt voor de bepaling. Stoffen met een oplosbaarheid in water van minder dan 1 mg/l hoeven niet te worden onderzocht.

1.6.1. **Plaatmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 (« Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films »).

1.6.2. **Beugelmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 (« Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films »).

1.6.3. **Ringmethode**

Zie ISO 304 en NF T 73-060 (« Surface Active Agents — Determination of Surface Tension by Drawing up Liquid Films »).

1.6.4. **Geharmoniseerde ringmethode (OESO)**1.6.4.1. *Apparatuur*

In de handel verkrijgbare spanningsmeters kunnen voor deze metingen worden gebruikt. Zij bestaan uit :

- draaitafeltje;
- systeem voor het meten van de kracht;
- meetlichaam (ring);
- meetvat.

1.6.4.1.1. *Draaitafeltje*

Het draaitafeltje wordt gebruikt als draagvlak voor het meetvat met temperatuurregeling, waarin de te onderzoeken stof zich bevindt. Te samen met het systeem voor het meten van de kracht is het draaitafeltje aan een rek gemonteerd.

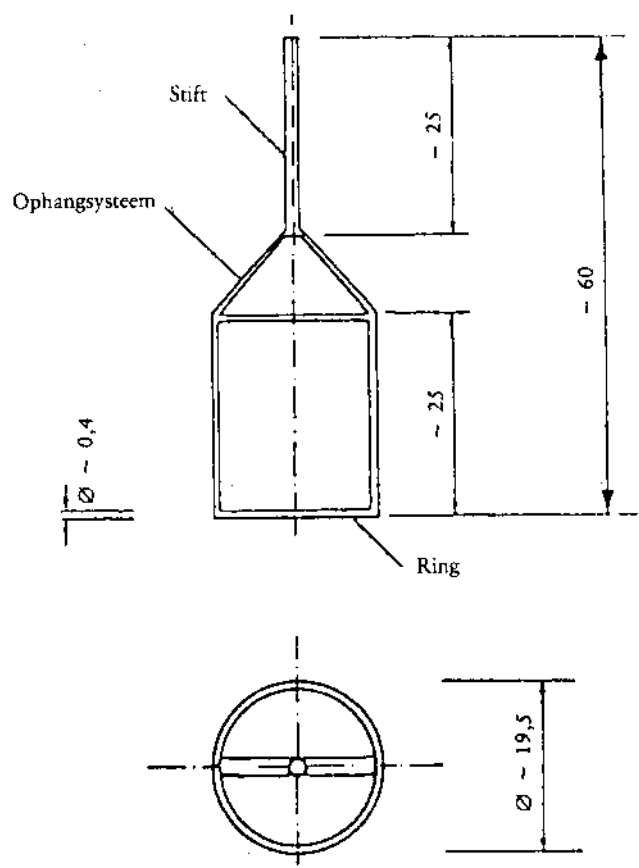
1.6.4.1.2. *Systeem voor het meten van de kracht*

Het systeem voor het meten van de kracht (zie figuur) bevindt zich boven het draaitafeltje. De fout bij het meten van de kracht mag niet meer bedragen dan $\pm 10^{-6}$ N, hetgeen overeenkomt met een foutgrens van $\pm 0,1$ mg in een massameting. De meetschaal van de in de handel verkrijgbare tensiometers is meestal geïjkt in mN/m zodat de oppervlaktespanning met een nauwkeurigheid van 0,1 mN/m rechtstreeks in mN/m kan worden afgelezen.

1.6.4.1.3. *Meetlichaam (ring)*

De ring bestaat meestal uit een draad van platina-iridium met een dikte van ongeveer 0,4 mm en een gemiddelde omtrek van 60 mm. De ring wordt horizontaal opgehangen aan een metalen stift en een ophangstelsel om de verbinding met het krachtmeetsysteem tot stand te brengen (zie figuur).

Figuur
Meetlichaam
(alle maten in mm)



1.6.4.1.4. Meetvat

Voor de te onderzoeken oplossing wordt een glazen meetvat met temperatuurregeling gebruikt. Het meetvat dient zo te zijn ontworpen dat tijdens de meting de temperatuur van de testvloeistof en de gasfase daarboven constant is en dat het monster niet kan verdampen. Ronde glazen bekertjes met een inwendige doorsnede van ten minste 45 mm zijn aanvaardbaar.

1.6.4.2. Voorbereiding van het apparaat

1.6.4.2.1. Schoonmaken

Glazen vaten dienen zorgvuldig te worden schoongemaakt. Zo nodig moeten zij worden gespoeld met heet chroomzuur en vervolgens met stroperig fosforzuur (83 tot 98 gewichtsprocent H_3PO_4), dan grondig gespoeld met leidingwater, uitgewassen met tweemaal gedestilleerd water tot een neutrale pH, en vervolgens gedroogd of omgespoeld met een gedeelte van de te onderzoeken vloeistof.

De ring wordt eerst zorgvuldig in water gespoeld ten einde water-oplosbare stoffen te verwijderen, daarna kort in chroomzuur gedompeld, in tweemaal gedestilleerd water gewassen tot een neutrale pH is bereikt en ten slotte kort verhit boven een methanolvlam.

NB :

Verontreinigende stoffen zoals siliconen die niet in chroomzuur of fosforzuur oplossen, dienen met een geschikt organisch oplosmiddel te worden verwijderd.

1.6.4.2.2. Ijking van het apparaat

Bij de validering van het apparaat wordt het nulpunt gecontroleerd en zodanig ingesteld dat met de uitslag van de wijzer een nauwkeurige bepaling in mN/m mogelijk is.

Opstellen :

Het apparaat wordt, bij voorbeeld met behulp van een waterpas aan de onderzijde van de tensiometer, horizontaal opgesteld; hiertoe wordt gebruik gemaakt van de schroeven aan de onderzijde van het apparaat.

Instelling van het nulpunt :

Na het aanbrengen van de ring aan het apparaat en alvorens deze in de vloeistof te dompelen wordt de wijzer van de tensiometer op nul gezet en wordt nagegaan of de ring evenwijdig aan het vloeistofoppervlak loopt. Hierbij kan het vloeistofoppervlak als spiegel worden gebruikt.

Ijking :

Het ijken kan op twee manieren geschieden :

- (a) Met behulp van een massa; hierbij worden ruiters met een bekende massa van 0,1 tot 1,0 g op de ring aangebracht; de ijfactor Φ_a , waarmee alle afgelezen waarden moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking (1):

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

waarin:

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

m = massa van de ruiters (g)

g = versnelling door de zwaartekracht ($981 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-2}$ op zeeniveau)

b = gemiddelde omtrek van de ring (in cm)

σ_a = uitslag van de tensiometer na het plaatsen van de ruiters op de ring (mN/m).

(b) Met behulp van water; hierbij wordt gebruik gemaakt van zuiver water met een oppervlaktespanning van bij voorbeeld 72,3 mN/m bij 23 °C; deze procedure verloopt weliswaar vlotter dan die met de ruiters, maar houdt steeds het gevaar in dat de oppervlaktespanning van het water onjuist is door de aanwezigheid van sporen oppervlakreactieve stoffen.

De ijkfactor, Φ_b , waarmee alle meetresultaten moeten worden vermenigvuldigd, wordt bepaald met behulp van de volgende vergelijking (2):

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

waarin:

σ_o = literatuurwaarde voor de oppervlaktespanning van water (mN/m),

σ_g = gemeten waarde voor de oppervlaktespanning van het water (mN/m),

beide bij dezelfde temperatuur.

1.6.4.3. Bereiding van de monsters

De te onderzoeken stoffen worden tot de gewenste concentraties in water opgelost; er mogen geen onoplosbare stoffen in het water voorkomen.

De oplossing moet op constante temperatuur worden gehouden ($\pm 0,5$ °C). Aangezien de oppervlaktespanning van een oplossing in het meetvat met de tijd verandert, moeten er op verschillende tijdstippen metingen worden verricht en moet van de resultaten een kromme worden uitgezet waaruit het verloop van de oppervlaktespanning als functie van de tijd blijkt. Zodra geen verdere wijzigingen meer worden waargenomen, is er een evenwichtstoestand bereikt.

Stof en gasvormige verontreinigingen beïnvloeden het resultaat van de meting. De meting dient derhalve te worden verricht onder een scherm.

1.6.5. Testomstandigheden

De metingen dienen plaats te vinden bij ongeveer 20 °C en de temperatuur dient op $\pm 0,5$ °C na constant te zijn.

1.6.6. Uitvoering van de proef

De te meten oplossingen dienen in het zorgvuldig schoongemaakte meetvat te worden overgebracht waarbij schuimvorming wordt vermeden; vervolgens wordt het meetvat op de tafel van het testapparaat geplaatst. Het tafelblad met het meetvat wordt omhoog gebracht tot de ring is gedompeld onder het oppervlak van de te onderzoeken oplossing. Vervolgens laat men het tafelblad geleidelijk en regelmatig (met een snelheid van ongeveer 0,5 cm/min) zakken om de ring van het oppervlak vrij te maken, tot de maximale kracht is bereikt. De vloeistoflaag die aan de ring hangt, mag de ring niet loslaten. Na de meting wordt de ring weer onder het oppervlak gedompeld en wordt de meting herhaald tot een constante waarde voor de oppervlaktespanning is bereikt. Bij iedere bepaling dient de tijd, die verlopen is sinds het overbrengen van de vloeistof naar het meetvat, te worden genoteerd. De meter wordt afgelezen op het moment van de maximale kracht die vereist is om de ring van het oppervlak van de vloeistof los te trekken.

2. GEGEVENS

Ter berekening van de oppervlaktespanning wordt de van het apparaat afgelezen waarde in mN/m eerst vermenigvuldigd met de ijkfactor Φ_a of Φ_b (afhankelijk van de toegepaste ijkprocedure). Dit leidt tot een waarde die slechts bij benadering juist is en daarom nog verder moet worden gecorrigeerd.

Harkins en Jordan (4) hebben langs empirische weg correctiefactoren bepaald voor oppervlaktespanningen die met de ringmethode zijn gemeten; deze correctiefactoren zijn afhankelijk van de afmetingen van de ring, de dichtheid van de vloeistof en de oppervlaktespanning.

Het is tamelijk omslachtig om de correctiefactor voor iedere meting afzonderlijk met behulp van de tabellen van Harkins en Jordan te bepalen voor de berekening van de oppervlaktespanning; daarom kan voor waterige oplossingen gebruik worden gemaakt van een vereenvoudigde procedure waarbij de gecorrigeerde waarden voor de oppervlaktespanning rechtstreeks uit de volgende tabel worden afgelezen (tussenliggende waarden worden via interpolatie verkregen).

TABEL: CORRECTIE VAN DE GEMETEN OPPERVLAKTESPANNING

Uitsluitend voor waterige oplossingen, $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$

R = 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring)

r = 0,185 mm (straal van de draad van de ring)

Gemeten waarde	Gecorrigeerde waarde (mN/m)	
	Ijking met massa (zie 1.6.4.2.2 (a))	Ijking met water (zie 1.6.4.2.2 (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	—

Deze tabel werd opgesteld aan de hand van de correctie volgens Harkins en Jordan en overeenkomstig de DIN-normen (DIN 53914) voor water en waterige oplossingen (met een dichtheid van $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) en voor in de handel verkrijgbare ringen met afmetingen R = 9,55 mm (gemiddelde straal van de ring) en r = 0,185 mm (straal van de draad van de ring). De tabel geeft de gecorrigeerde waarden voor oppervlaktespanningsmetingen die werden uitgevoerd na ijking met massa of met water.

Volgens een alternatieve methode zonder voorafgaande ijking kan de oppervlaktespanning als volgt worden berekend:

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

waarin:

F = de kracht die op de dynamometer wordt afgelezen bij het breken van de film

R = de straal van de ring

f = de correctiefactor (1).

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFENEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen:

- gebruikte testmethode;
- gebruikt type water of oplossing;
- nauwkeurige specificatie van de stoffen (beschrijving en verontreinigingen);

— meetresultaten : afgelezen oppervlaktespanning waarbij zowel de afzonderlijke resultaten als het rekenkundig gemiddelde daarvan moet worden vermeld, alsmede het gecorrigeerde gemiddelde (waarbij rekening is gehouden met de correctiefactor voor het apparaat en de correctietabel);

— concentratie van de oplossing;
— temperatuur bij de meting;
— ouderdom van de gebruikte oplossing, en met name de tijd tussen de bereiding en de meting van de oplossing;
— beschrijving van de tijdafhankelijkheid van de oppervlaktespanning, na het overbrengen van de oplossing in het meetvat;

— alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, en met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de stof.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Met het oog op het feit dat gedestilleerd water een oppervlaktespanning heeft van 72,75 mN/m bij 20 °C, dienen stoffen met een oppervlaktespanning van minder dan 60 mN/m, zoals gemeten met deze methode, beschouwd te worden als oppervlakreactieve stoffen.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115 — Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.
- (3) Pure Appl. Chem., 1976, Vol. 48, 511.
- (4) Harkins, W. D., Jordan, H. F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, Vol. 52, 1751.

A.6. OPLOSBAARHEID IN WATER

1. METHODE

De beschreven methoden berusten op de testrichtlijn van de OESO (1).

1.1. INLEIDING

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuurformule, de dampspanning, de dissociatieconstanten en de hydrolyse (als functie van de pH) van de stof.

Er bestaat niet één methode waarmee alle mogelijke waarden van de oplosbaarheid in water kunnen worden onderzocht.

De twee hieronder beschreven meetmethoden beslaan alle mogelijke waarden van de oplosbaarheid maar zijn niet van toepassing op vluchtige stoffen :

— de eerste methode wordt aangeduid als de "kolom-elutie"-methode en is van toepassing op chemisch zuivere stoffen met een geringe oplosbaarheid ($< 10^{-2}$ g/l), welke stabiel zijn in water;

— de tweede methode wordt aangeduid als de "methode met de kolf" en is van toepassing op chemisch zuivere stoffen met een hogere oplosbaarheid ($> 10^{-2}$ g/l), welke stabiel zijn in water;

De oplosbaarheid in water van de te onderzoeken stof kan aanzienlijk worden beïnvloed door de aanwezigheid van verontreinigingen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De oplosbaarheid van een stof in water wordt opgegeven als de massaconcentratie van de stof in een verzadigde oplossing in water bij een gegeven temperatuur. De oplosbaarheid in water wordt uitgedrukt in eenheden massa per volume oplossing. De SI-eenheid is kg/m^3 (g/l kan ook worden gebruikt).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methodes mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

De hoeveelheid van het monster en de tijd die nodig zijn om de verzadigingswaarde van de massaconcentratie te bereiken, moeten bij benadering worden bepaald in een eenvoudige inleidende test.

1.4.1. Kolom-elutie-methode

Deze methode is gebaseerd op de elutie van de te onderzoeken stof met water uit een microkolom welke is gevuld met een inert dragermateriaal zoals glaspereels of zand, gedekt met een overmaat aan de te onderzoeken stof. De oplosbaarheid in water is bepaald zodra de massaconcentratie van het eluaat constant is. Dit blijkt uit een constante concentratiewaarde als functie van de tijd.

1.4.2. Methode met de kolf

Bij deze methode wordt de stof (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt) opgelost in water bij een temperatuur die iets hoger is dan de testtemperatuur. Zodra verzadiging is bereikt wordt het mengsel afgekoeld en op de testtemperatuur gehouden, terwijl net zo lang wordt geroerd totdat er een evenwichtstoestand is bereikt. Als alternatief kan de meting rechtstreeks bij de testtemperatuur uitgevoerd worden, op voorwaarde dat men er, via geschikte monsternames, zeker van is dat het verzadigingsevenwicht bereikt is. Vervolgens wordt de massaconcentratie van de stof in de waterige oplossing, welke geen onopgeloste deeltjes mag bevatten, bepaald aan de hand van een geschikte analysemethode.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. Herhaalbaarheid

Voor de kolom-elutie-methode kan < 30 % haalbaar zijn; voor de methode met de kolf dient < 15 % in acht te worden genomen.

1.5.2. Gevoeligheid

Deze is afhankelijk van de analysemethode, maar het is mogelijk massaconcentraties te bepalen tot een waarde van 10^{-6} g/l.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

1.6.1. Testomstandigheden

De test wordt bij voorkeur uitgevoerd bij $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Als wordt verwacht dat de oplosbaarheid temperatuurafhankelijk is ($> 3\%$ per $^{\circ}\text{C}$), dan wordt nog bij twee andere temperaturen gemeten, die tenminste $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ boven, respectievelijk $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ onder de eerste temperatuur liggen. In dit geval dient de temperatuurregeling op $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ nauwkeurig te zijn. De gekozen temperatuur moet in alle betrokken delen van de apparatuur constant worden gehouden.

1.6.2. Inleidende test

In een maatcilinder van 10 ml, voorzien van een glazen stop, wordt gedestilleerd water op kamertemperatuur toegevoegd aan ongeveer 0,1 g monster (vaste stoffen moeten worden fijngemaakt). Toenemende volumes gedestilleerd water worden stapsgewijze toegevoegd, volgens onderstaande tabel.

0,1 g opgeloste stof in „x” ml water	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Oplosbaarheid bij benadering (g/l)	> 1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Nadat de aangegeven hoeveelheid water is toegevoegd, wordt het mengsel telkens gedurende tien minuten hard geschud en vervolgens visueel onderzocht op eventuele onopgeloste delen van het monster. Als het monster of delen ervan onopgelost zijn nadat nog 10 ml water is toegevoegd, dient het experiment te worden herhaald in een maatcilinder van 100 ml met grotere volumes water. De tijd die nodig is om een stof op te lossen kan bij lagere waarden van de oplosbaarheid aanzienlijk langer zijn (minimaal 24 uur dient in acht te worden genomen). De benaderde waarde van de oplosbaarheid is in de tabel vermeld onder de hoeveelheid water waarin het monster geheel wordt opgelost. Als de stof nog steeds onoplosbaar blijkt moet meer dan 24 uur gewacht worden (maximaal 96 uur), of dient verdere verdunning plaats te vinden om te bepalen of de kolom-elutie-methode dan wel de methode met de kolf moet worden gebruikt.

1.6.3. Kolom-elutie-methode

1.6.3.1. Dragermateriaal, oplosmiddel en eluens

Het dragermateriaal voor de kolom-elutie-methode moet inert zijn. Bruikbare materialen zijn bij voorbeeld glaspel en zand. Voor het aanbrengen van de te onderzoeken stof op het dragermateriaal dient gebruik te worden gemaakt van een geschikt vluchtig en analytisch zuiver oplosmiddel. Als eluens dient water, dat tweemaal gedestilleerd is in glas- of kwartsapparatuur, te worden gebruikt.

Opmerking :

Er mag geen gebruik worden gemaakt van water dat rechtstreeks uit een organische ionenwisselaar komt.

1.6.3.2. Laden van het dragermateriaal

Ongeveer 600 mg dragermateriaal wordt afgewogen en overgebracht in een rondbodemkolf van 50 ml.

Een afgewogen hoeveelheid van de te onderzoeken stof wordt opgelost in het gekozen oplosmiddel. De juiste hoeveelheid van deze oplossing wordt bij het dragermateriaal gevoegd. Het oplosmiddel moet, bij voorbeeld in een roterende verdampert, volledig worden verdampt. Bij onvolledige verwijdering van het oplosmiddel kan het dragermateriaal, ten gevolge van verdelingseffecten aan het oppervlak, later niet worden verzadigd met water.

Het laden van het dragermateriaal kan aanleiding geven tot problemen (onjuiste resultaten) als de te onderzoeken stof wordt afgezet als olie of in een andere kristalvorm. Dit probleem moet experimenteel worden onderzocht en de bijzonderheden moeten worden gerapporteerd.

Het beladen dragermateriaal wordt gedurende ongeveer twee uur bevochtigd in ongeveer 5 ml water, waarna de suspensie wordt aangebracht op de microkolom. Anderzijds kan men ook het droge, beladen dragermateriaal direct in de met water gevulde microkolom brengen, en daarna ongeveer twee uur wachten totdat een evenwichtstoestand is ontstaan.

Testprocedure :

De stof kan op twee verschillende manieren van het dragermateriaal worden geëluëerd :

- recirculatiepomp (zie figuur 1);
- voorraadfles (zie figuur 4).

1.6.3.3. Kolom-elutie-methode met recirculatiepomp

Apparatuur

Een schema van het systeem is afgebeeld in figuur 1. In figuur 2 is een geschikte microkolom afgebeeld : elke maat is echter aanvaardbaar mits deze voldoet aan de criteria voor reproduceerbaarheid en gevoeligheid. De kolom moet aan de bovenzijde zijn voorzien van een reservoir voor ten minste vijf kolomvolumina water, en moet minimaal vijf monsters kunnen bevatten. Eventueel kunnen de afmetingen worden verminderd indien extra oplosmiddel wordt gebruikt ter vervanging van de eerste vijf kolomvolumina welke met verontreinigingen worden afgevoerd.

De kolom moet worden aangesloten op een recirculatiepomp waarmee een debiet van ongeveer 25 ml/uur kan worden ingesteld. De pomp wordt aangesloten door middel van polytetrafluorethyleen (PTFE) en/of glazen verbindingstukken. De kolom en de pomp moeten zo worden opgesteld dat het mogelijk is om monsters te nemen van de uitstromende vloeistof en om het reservoir in evenwicht te houden met de atmosferische druk. Het kolommateriaal wordt ondersteund door een kleine (5 mm) prop glaswol waarmee ook deeltjes worden weggefilterd. Als recirculatiepomp kan bij voorbeeld een peristaltische pomp of een membraanpomp worden gebruikt (er moet op worden toegezien dat aan de slangwand geen verontreiniging en/of adsorptie plaatsvindt).

Meetprocedure

De stroming door de kolom wordt op gang gebracht. Een debiet van ongeveer 25 ml/uur (dit komt overeen met ongeveer 10 kolomvolumina/uur voor de beschreven kolom) wordt aanbevolen. De eerste vijf kolomvolumina (minimaal) worden afgevoerd om wateroplosbare verontreinigingen te verwijderen. Vervolgens wordt de recirculatiepomp aan de onderzijde van de kolom aangesloten. De apparatuur blijft in werking totdat een evenwichtstoestand is bereikt; hiervoor geldt dat de concentraties in vijf opeenvolgende monsters niet meer dan $\pm 30\%$ mogen verschillen op aselechte wijze. Tussen de tijdstippen, waarop deze monsters worden genomen, moeten ten minste 10 kolomvolumina van het eluens passeren.

1.6.3.4. Kolom-elutie-methode met voorraadfles

Apparatuur (zie figuren 3 en 4)

Vorraadfles : voor aansluiting van de voorraadfles wordt gebruik gemaakt van een rond glazen slijpstuk en polytetrafluorethyleenslangen. Een debiet van ongeveer 25 ml/uur wordt aanbevolen. Er wordt een aantal opeenvolgende monsters van het eluaat genomen voor analyse volgens de gekozen methode.

Meetprocedure

In het middengebiet van het eluaat, wanneer de concentraties constant zijn ($\pm 30\%$) in tenminste vijf opeenvolgende fracties, worden deze fracties gebruikt om de oplosbaarheid in water te bepalen.

In beide gevallen (circulatiepomp of voorraadfles) moet een tweede reeks metingen worden verricht waarbij het debiet de helft is van de aanvankelijke waarde. Als de resultaten van beide series metingen overeenstemmen, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de oplosbaarheid bij het laagste debiet hoger blijkt, dan moet het halveren van het debiet worden voortgezet, totdat twee opeenvolgende series metingen dezelfde oplosbaarheid geven.

In beide gevallen (circulatiepomp of voorraadfles) moeten de monsters aan de hand van het Tyndall-effect (verstrooiing van licht) worden gecontroleerd op aanwezigheid van deeltjes in colloïdale toestand. De aanwezigheid van dergelijke deeltjes maakt de resultaten ongeldig, zodat de test moet worden herhaald nadat de filterwerking van de kolom is verbeterd.

De pH van elk monster moet worden geregistreerd. Er moet een tweede serie metingen worden uitgevoerd bij dezelfde temperatuur.

1.6.4. Methode met de kolf

1.6.4.1. Apparatuur

Voor de methode met de kolf is het volgende materiaal nodig :

- gangbaar laboratoriumglaswerk en -apparatuur;
- een apparaat om de oplossingen in beweging te brengen bij constante temperatuur;
- zo nodig voor emulsies een centrifuge (bij voorkeur met thermostaat);
- apparatuur voor analytische bepaling.

1.6.4.2. Meetprocedure

Aan de hand van de inleidende test wordt bepaald hoeveel materiaal nodig is om de gewenste hoeveelheid water te verzadigen. De benodigde hoeveelheid water hangt af van de analysemethode en van de oplosbaarheid. In drie van een glazen stop voorziene glazen vaten (bij voorbeeld centrifugebuizen, kolven) wordt telkens ongeveer vijfmaal de aldus bepaalde hoeveelheid materiaal afgewogen. De gewenste hoeveelheid water wordt in elk vat gegoten, waarna de vaten goed worden afgesloten. De afgesloten vaten worden vervolgens bij een temperatuur van 30 °C in beweging gebracht. (Hiervoor wordt een schud- of roermachine gebruikt waarmee bij constante temperatuur kan worden gewerkt, bij voorbeeld een magneetroerder in een waterbak met thermostaatregeling.) Na één dag wordt één van de vaten verwijderd, waarna onder af en toe roeren 24 uur wordt gewacht totdat bij de testtemperatuur een nieuwe evenwichtstoestand is ontstaan. Vervolgens wordt de inhoud van het vat gecentrifugeerd bij de testtemperatuur, waarna de concentratie van de teststof in de heldere waterige oplossing analytisch wordt bepaald. De beide andere kolven ondergaan dezelfde behandeling nadat zij gedurende twee respectievelijk drie dagen bij 30 °C zijn geëquilibreerd. Als de waarden voor de concentratie in tenminste de laatste twee vaten voldoen aan de vereiste reproduceerbaarheid, worden de testresultaten geaccepteerd. Als de resultaten van de vaten 1, 2 en 3 toenemende waarden geven, moet de hele test worden herhaald, waarbij langer wordt gewacht tot een evenwichtstoestand is ontstaan.

De meetprocedure kan ook worden uitgevoerd zonder voorverwarming bij 30 °C. Om de snelheid te kunnen schatten waarmee het verzadigingsevenwicht zich instelt, worden monsters genomen totdat blijkt dat verder roeren geen invloed meer heeft op de concentratie van de testoplossing.

De pH van elk monster moet worden geregistreerd.

1.6.5. Analyse

Hiervoor dient bij voorkeur een methode te worden toegepast waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden, aangezien kleine hoeveelheden opgeloste verontreinigingen kunnen leiden tot grote fouten in de gemeten oplosbaarheid. Voorbeelden van zulke methoden zijn : gas- of vloeistofchromatografie, titratie, fotometrie, voltametrie.

2. GEGEVENS

2.1. KOLOM-ELUTIE-METHODE

Voor elke serie metingen moeten het gemiddelde en de standaardafwijking worden berekend van tenminste vijf opeenvolgende monsters, die op het verzadigingsniveau zijn genomen. De resultaten moeten worden opgegeven in eenheden massa per volume oplossing.

De gemiddelden van twee metingen met verschillend debiet moeten worden vergeleken en moeten een herhaalbaarheid beter dan 30 % hebben.

2.2. METHODE MET DE KOLF

Voor de drie kolven moeten de afzonderlijke resultaten worden vermeld en het gemiddelde van de als constant beschouwde resultaten (herhaalbaarheid beter dan 15 %) moet worden bepaald en opgegeven in eenheden massa per volume oplossing. Hiervoor kan het nodig zijn massa-eenheden om te rekenen naar volume-eenheden, waarbij rekening wordt gehouden met de dichtheid indien de oplosbaarheid zeer hoog is (> 100 g/l).

3. RAPPORTAGE

3.1. KOLOM-ELUTIE-METHODE

Het rapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten :

- de resultaten van de inleidende test;
- nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);
- de afzonderlijke concentraties, debieten en pH-waarden van elk monster;
- het gemiddelde en de standaardafwijking van ten minste vijf monsters uit elke serie die zijn genomen op het verzadigingsniveau;
- het gemiddelde van de twee opeenvolgende acceptabele series;
- de temperatuur van het water tijdens het verzadigingsproces;
- de toegepaste analysemethode;
- de aard van het toegepaste dragermateriaal;
- het laden van het dragermateriaal;
- het gebruikte oplosmiddel;
- elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test en de gebruikte methode;

— alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

3.2. METHODE MET DE KOLF

Het rapport dient zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten :

- de resultaten van de inleidende test;
- nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);
- de afzonderlijke analyses en het gemiddelde, indien meer dan één waarde werd bepaald, voor iedere kolf;
- de pH van elk monster;
- het gemiddelde van de waarden voor de verschillende kolven die onderling overeenstemden;
- de testtemperatuur;
- de toegepaste analysemethode;
- elke gebleken chemische instabiliteit van de stof tijdens de test en de gebruikte methode;
- alle gegevens en opmerkingen, die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

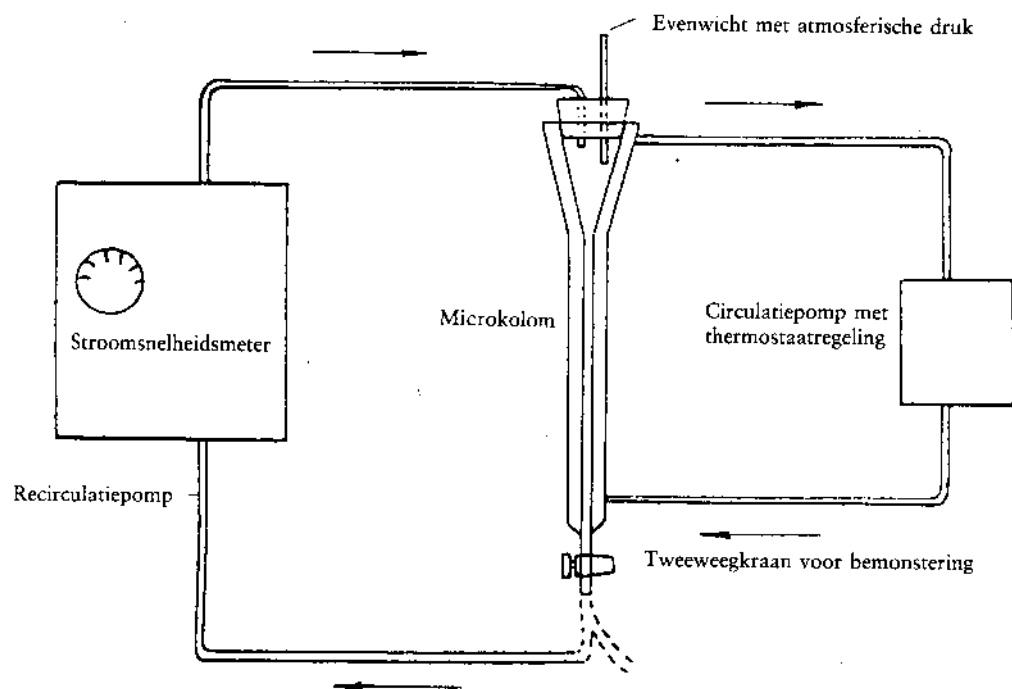
4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105 — Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

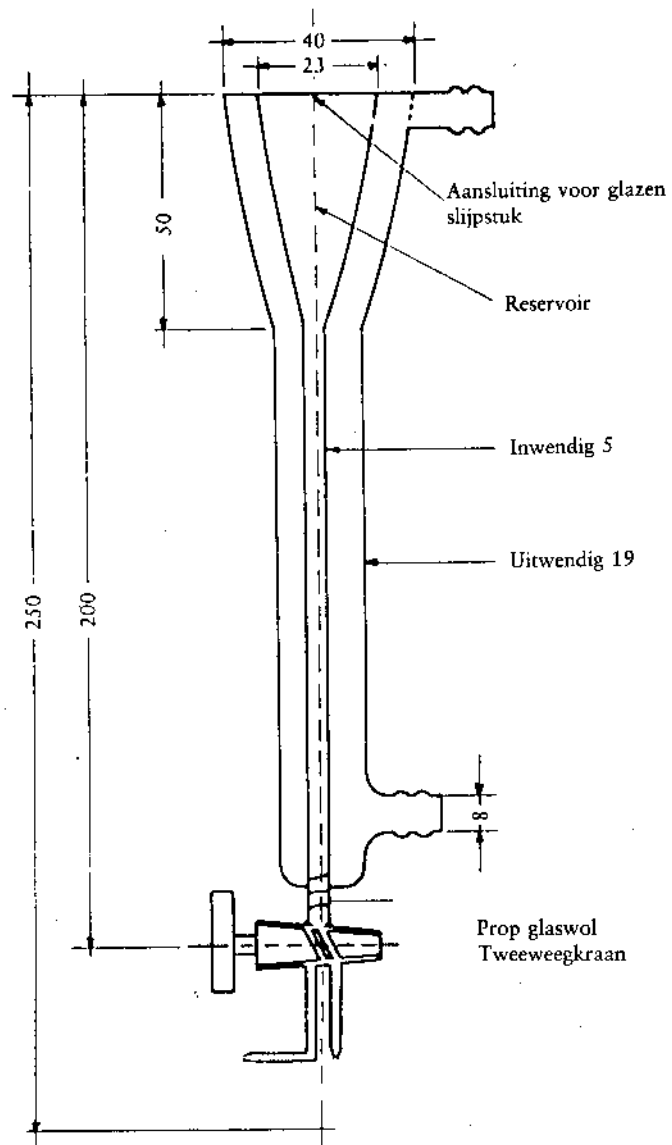
Aanhangsel

Figuur 1

Kolom-elutie-methode met recirculatiepomp

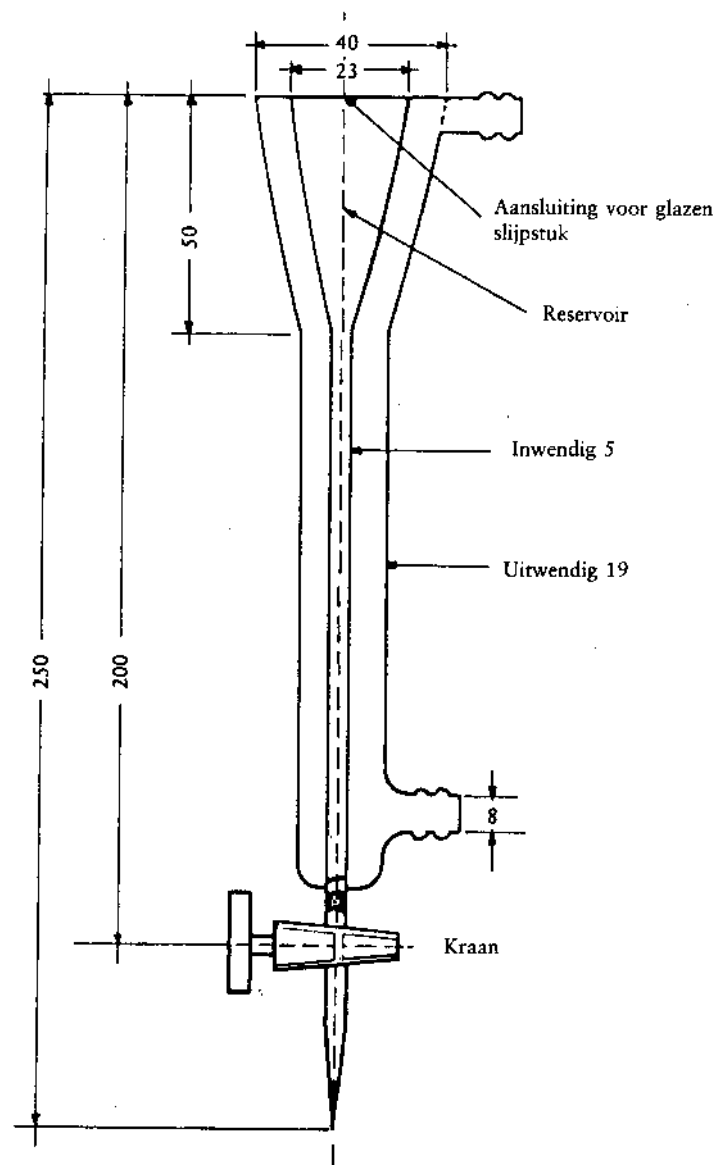


Figuur 2
- Een voorbeeld van een microkolom
(alle afmetingen in mm)

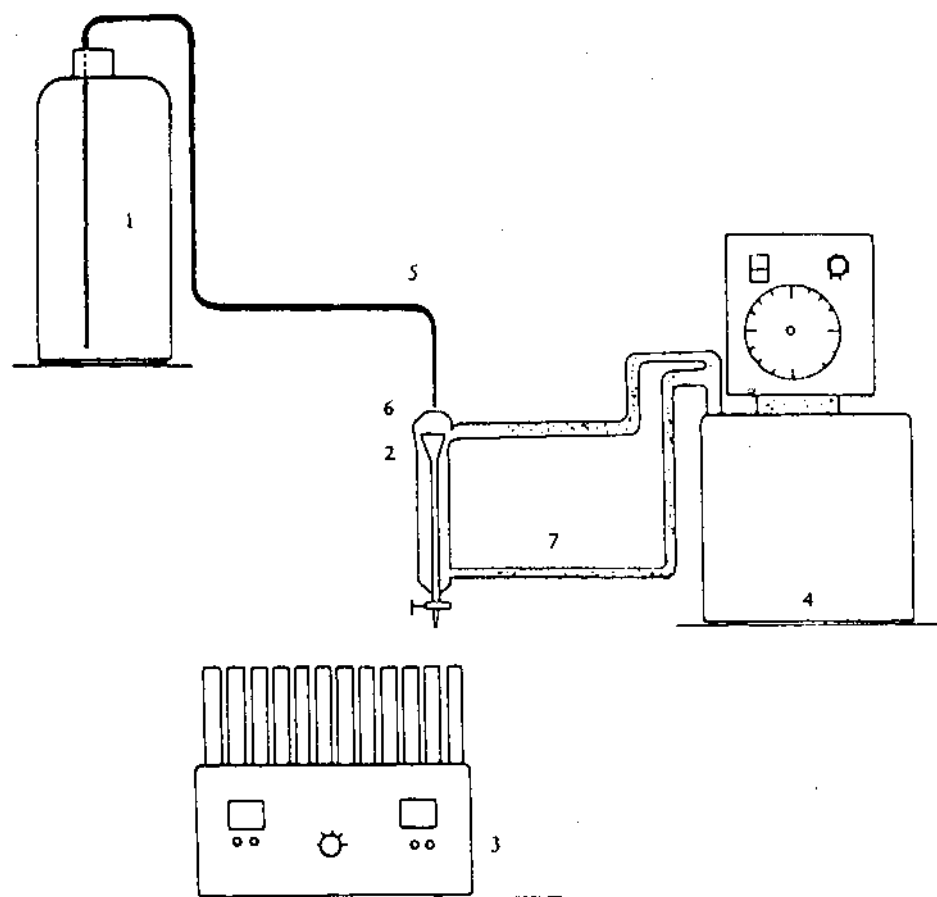


Figuur 3

Een voorbeeld van een microkolom
(alle afmetingen in mm)



Figuur 4
Kolom-elutie-methode met voorraadfles



- 1 = voorraadfles (bij voorbeeld een glazen fles van 2,5 liter)
- 2 = kolom (zie figuur 3)
- 3 = monsterverzamelaar
- 4 = thermostaat
- 5 = teflonslang
- 6 = glazen slijpstuk
- 7 = waterleiding (tussen thermostaat en kolom, inwendige diameter ongeveer 8 mm)

A.8. VERDELINGSCOËFFICIËNT

1. METHODE

De "schudfles"-methode berust op de testrichtlijn van de OESO (1).

1.1. INLEIDING

Voor het uitvoeren van deze test is het nuttig om van tevoren te beschikken over gegevens inzake de structuurformule, dissociatieconstante, oplosbaarheid in water, hydrolyse, oplosbaarheid in *n*-octanol en oppervlaktespanning van de stof.

Metingen van ioniseerbare stoffen dienen alleen te worden uitgevoerd met de niet-geïoniseerde vorm van de stof (vrij zuur of vrije base) verkregen met behulp van een geschikte buffer met een pH van minstens één pH-eenheid onder (vrij zuur) of boven (vrije base) de pK.

Deze testmethode omvat twee verschillende procedures: de schudflesmethode en de hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC). De eerste methode is toepasbaar wanneer de $\log P_{ow}$ -waarde (zie verder voor definities) in het bereik van -2 tot 4 valt, de tweede methode in het bereik van 0 tot 6. Alvorens een van beide experimentele procedures uit te voeren, dient eerst een voorlopige schatting van de verdelingscoëfficiënt te worden gemaakt.

De schudflesmethode is alleen van toepassing op chemisch zuivere stoffen die oplosbaar zijn in water en *n*-octanol. De methode is niet van toepassing op oppervlakteaactieve stoffen (waarvoor een berekende waarde of een raming, gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in *n*-octanol en water, moet worden gerapporteerd).

De HPLC-methode is niet toepasbaar op sterke zuren en basen, metaalcomplexen en oppervlakteaactieve stoffen die met het eluent kunnen reageren. Voor deze stoffen dient een berekende waarde of een raming, gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in *n*-octanol en water, te worden gerapporteerd.

De HPLC-methode is minder gevoelig voor de aanwezigheid van verontreinigingen in de teststof dan de schudflesmethode. Desondanks kunnen verontreinigingen soms de interpretatie van de resultaten bemoeilijken omdat moeilijk kan worden bepaald welke piek bij welke stof hoort. Voor mengsels die een band zonder resolutie geven, moeten de boven- en ondergrens van $\log P$ worden gerapporteerd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De verdelingscoëfficiënt (*P*) is gedefinieerd als de verhouding van de concentraties in evenwichtstoestand (*C_i*) van een opgeloste stof in een twee-fasensysteem bestaande uit twee niet-mengbare oplosmiddelen. Voor *n*-octanol en water:

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

De verdelingscoëfficiënt (*P*) is daarom het quotiënt van twee concentraties; gewoonlijk wordt deze waarde opgegeven als een logaritme met grondtal tien ($\log P$).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Schudflesmethode

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

HPLC-methode

Om de gemeten HPLC-gegevens van een stof te kunnen correleren met de *P*-waarde, moet een ijklijn worden gemaakt van $\log P$ tegen de chromatografische gegevens, met behulp van minstens 6 referentiepunten. De gebruiker dient de geschikte referentiestoffen te kiezen. Zo mogelijk dient de P_{ow} -waarde van minstens één referentiestof boven, en die van minstens één referentiestof onder de P_{ow} van de teststof te liggen. Voor $\log P$ -waarden kleiner dan 4 kan bij de ijkking worden uitgegaan van met de schudflesmethode verkregen gegevens. Voor $\log P$ -waarden groter dan 4 kan de ijkking worden uitgevoerd met behulp van gevalideerde waarden uit de literatuur, op voorwaarde dat deze overeenkomen met de berekende waarden. Voor een grotere nauwkeurigheid verdient het de voorkeur om referentiestoffen te kiezen die qua structuur verwant zijn aan de te onderzoeken stof.

Er zijn uitgebreide lijsten beschikbaar met $\log P_{ow}$ -waarden voor verschillende categorieën chemicaliën (2)(3). Als er geen gegevens over de verdelingscoëfficiënt van structureel verwante stoffen beschikbaar zijn, mag een meer algemene ijkking worden toegepast met andere ijkstoffen.

In aanhangsel 2 wordt een lijst van aanbevolen ijkstoffen en hun P_{ow} -waarden gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

1.4.1. *Schudflesmethode*

Om een verdelingscoëfficiënt te kunnen bepalen, moet een evenwichtstoestand zijn bereikt tussen alle componenten van het systeem; de concentraties van de opgeloste stoffen moeten vervolgens in beide fasen worden bepaald. Uit de literatuur blijkt dat er voor dit probleem, dat wil zeggen het grondig mengen van beide fasen gevolgd door fasescheiding ten einde de evenwichtsconcentraties van de te onderzoeken stof te bepalen, verschillende technische oplossingen bestaan.

1.4.2. *HPLC-methode*

HPLC wordt uitgevoerd met analytische kolommen, gepakt met een in de handel verkrijgbare vaste fase, bestaande uit chemisch aan silica gebonden lange koolwaterstofketens (bij voorbeeld C_8 , C_{18}). Chemische stoffen die in deze kolommen geïnjecteerd worden, bewegen met verschillende snelheden door deze kolommen, wat een gevolg is van het verschil in verdeling tussen de mobiele fase en de stationaire koolwaterstoffase. Mengsels van stoffen worden geëluëerd in volgorde van waterafstotendheid, wateroplosbare stoffen het eerst en olieoplosbare stoffen het laatst, afhankelijk van hun koolwaterstof/water-verdelingscoëfficiënt. Op deze wijze kan de verhouding tussen de retentietijd in de (omgekeerde) kolom en de *n*-octanol/water-verdelingscoëfficiënt worden bepaald. De verdelingscoëfficiënt wordt afgeleid uit de capaciteitsfactor *k*, met de volgende formule:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

waarin t_R = retentietijd van de te onderzoeken stof, en t_0 = gemiddelde tijd die een molecuul van het oplosmiddel nodig heeft om de kolom te passeren (dode tijd).

Kwantitatieve analysemethoden zijn niet vereist, alleen de elutietijd moet worden bepaald.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. Herhaalbaarheid

Schudflesmethode

Om de nauwkeurigheid van de verdelingscoëfficiënt te garanderen moeten duplo-metingen worden verricht onder drie uiteenlopende testomstandigheden; hierbij kan zowel de hoeveelheid stof als de verhouding van de hoeveelheden oplosmiddel worden gevarieerd. De gevonden waarden van de verdelingscoëfficiënt moeten, uitgedrukt in gewone logaritmen, binnen een interval van $\pm 0,3$ log-eenheden vallen.

HPLC-methode

Om de betrouwbaarheid van de meting te vergroten moeten duplo-metingen worden verricht. De log P-waarden, afgeleid uit de individuele metingen, moeten binnen een bereik van $\pm 0,1$ log-eenheid liggen.

1.5.2. Gevoeligheid

Schudflesmethode

Het meetbereik van de methode wordt bepaald door de detectiegrens van de analysemethode. Deze moet voldoende laag zijn om log P_{ow} -waarden in het bereik van -2 tot 4 te kunnen bepalen (onder speciale voorwaarden kan dit bereik uitgebreid worden tot een log P_{ow} van 5), wanneer de concentratie van de opgeloste stof in geen van beide fasen hoger is dan 0,01 mol per liter.

HPLC-methode

Met de HPLC-methode kunnen verdelingscoëfficiënten worden bepaald in het log P_{ow} -bereik van 0 tot 6.

Normaal gezien kan de verdelingscoëfficiënt van een mengsel worden geschat tot op ± 1 log-eenheid van de schudfleswaarde. Voorbeelden van correlaties kunnen worden teruggevonden in de literatuur (4, 5, 6, 7, 8). Grotere nauwkeurigheid kan meestal worden bereikt met behulp van correlatiekrommen gebaseerd op referentiemengsels met verwante structuur (9).

1.5.3. Specificiteit

Schudflesmethode

De verdelingswet van Nernst geldt alleen voor verdunde oplossingen bij constante temperatuur, druk en pH. De wet geldt bovendien voor een zuivere stof die wordt verdeeld tussen twee zuivere oplosmiddelen. Indien in één of beide fasen tegelijkertijd verschillende opgeloste stoffen voorkomen, dan kan dit van invloed zijn op de resultaten.

Dissociatie of associatie van de opgeloste moleculen leidt tot afwijkingen van de verdelingswet van Nernst. Dergelijke afwijkingen blijken uit de concentratieafhankelijkheid van de verdelingscoëfficiënt.

Wegens het voorkomen van meervoudige evenwichtstoestanden mag deze test niet zonder correcties worden toegepast op ioniseerbare stoffen. Voor dergelijke stoffen dient het gebruik van bufferoplossingen in plaats van water te worden overwogen; de pH van de buffer dient tenminste 1 pH-eenheid te verschillen van de pKa van de stof en men dient rekening te houden met het belang van deze pH met betrekking tot het milieu.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Inleidende schatting van de verdelingscoëfficiënt

De verdelingscoëfficiënt wordt bij voorkeur geschat aan de hand van een berekeningsmethode (zie aanhangsel 1) of, indien van toepassing, op basis van de oplosbaarheidsverhouding van de te onderzoeken stof in de zuivere oplosmiddelen (10).

1.6.2. Schudfles-methode

1.6.2.1. Voorbereiding

n-Octanol : de verdelingscoëfficiënt moet worden bepaald met analytisch zuiver oplosmiddel.

Water : er moet gebruik worden gemaakt van gedestilleerd of dubbel gedestilleerd water uit apparatuur van glas of kwarts. Voor ioniseerbare verbindingen dienen zo nodig bufferoplossingen in plaats van water te worden gebruikt.

Opmerking :

Er mag geen gebruik worden gemaakt van water dat rechtstreeks uit een ionenwisselaar komt.

1.6.2.1.1. Voorverzadiging van de oplosmiddelen

Alvorens een verdelingscoëfficiënt te bepalen, worden de fasen van het oplosmiddelsysteem onderling verzadigd door uitschudden bij de temperatuur van het experiment. Hiertoe is het handig om gedurende 24 uur twee grote voorraadflessen met analytisch zeer zuiver *n*-octanol, respectievelijk water, waaraan voldoende water respectievelijk *n*-octanol is toegevoegd, mechanisch te schudden en daarna te laten staan totdat de fasen zich afscheiden en een verzadigingstoestand is ontstaan.

1.6.2.1.2. Voorbereiding van de test

Het twee-fasensysteem moet het testvat bijna vullen. Aldus wordt vervluchtiging van de vloeistof voorkomen. De volumeverhouding en de benodigde hoeveelheid van de te onderzoeken stof worden bepaald door :

- de inleidende bepaling van de verdelingscoëfficiënt (zie 1.6.1);
- de minimale hoeveelheid van de te onderzoeken stof vereist voor de analyse;
- de beperking van de maximale concentratie in beide fasen tot 0,01 mol/l.

Er worden drie tests uitgevoerd : in de eerste test wordt gewerkt met de berekende volumeverhouding *n*-octanol/water; in de tweede test wordt deze verhouding gedeeld door twee, in de derde test wordt deze verhouding vermenigvuldigd met twee (bij voorbeeld 1 :1, 1 :2, 2 :1).

1.6.2.1.3. De te onderzoeken stof

Er wordt een voorraadoplossing bereid uit *n*-octanol voorverzadigd met water. De concentratie van deze voorraadoplossing moet nauwkeurig worden bepaald voor gebruik bij de bepaling van de verdelingscoëfficiënt. Deze oplossing moet onder stabiele omstandigheden bewaard worden.

1.6.2.2. Testomstandigheden

De testtemperatuur moet constant (± 1 °C) worden gehouden binnen een bereik van 20-25 °C.

1.6.2.3. Meetprocedure

1.6.2.3.1. Instelling van het verdelingsevenwicht

Voor de verschillende testomstandigheden moeten steeds twee testvaten worden gevuld met de vereiste, nauwkeurig bekende hoeveelheden van beide oplosmiddelen en de gewenste hoeveelheid voorraadoplossing.

Het volume van de *n*-octanol-fasen moet worden gemeten. De testvaten moeten in een schudmachine worden geplaatst of met de hand worden geschud. Aanbevolen wordt om, bij gebruik van een centrifugebuis, deze snel 180° te draaien om de transversale as, zodat de ingesloten lucht door de beide fasen omhoog beweegt. De ervaring heeft geleerd dat 50 van dergelijke bewegingen gewoonlijk voldoende zijn om het verdelingsevenwicht te bereiken. Om zeker te zijn wordt aangeraden om 100 bewegingen uit te voeren in 5 minuten.

1.6.2.3.2. Scheiding van de fasen

Indien noodzakelijk, moet het mengsel worden gecentrifugeerd om de fasen te scheiden. Dit moet worden gedaan in een laboratoriumcentrifuge bij kamertemperatuur; indien een centrifuge zonder temperatuurregeling wordt gebruikt, moeten de centrifugebuizen ten minste gedurende één uur op de testtemperatuur worden gehouden, zodat de evenwichtstoestand zich kan instellen voordat de analyse wordt uitgevoerd.

1.6.2.4. Analyse

Voor bepaling van de verdelingscoëfficiënt moet de concentratie van de te onderzoeken stof in beide fasen worden bepaald. Dit kan worden gedaan door onder de bemonstering van de water-fase kan een glazen injectiespuit met verwisselbare naald worden gebruikt. De injectiespuit moet van tevoren gedeeltelijk worden gevuld met lucht. De lucht moet zachtjes worden uitgedreven terwijl de naald door de *n*-octanol-fase wordt gestoken. De benodigde hoeveelheid van de water-fase wordt in de injectiespuit gezogen. De spuit wordt snel uit de oplossing gehaald, waarna de naald wordt losgemaakt. De inhoud van de injectiespuit kan nu worden gebruikt als monster van de water-fase. De concentratie in de twee afzonderlijke fasen dient bij voorkeur te worden bepaald met behulp van een analysemethode waarmee verschillende stoffen kunnen worden onderscheiden. Enkele voorbeelden van geschikte analysemethoden zijn :

- fotometrische methoden;
- gaschromatografie;
- hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC).

1.6.3. HPLC-METHODE

1.6.3.1. Voorbereiding

Apparatuur

Benodigd is een vloeistofchromatograaf, uitgerust met een niet-pulserende pomp en een geschikte detectie-inrichting. Het gebruik van een injectieventiel met injectielussen wordt aangeraden. Aangezien de aanwezigheid van polaire groepen in de stationaire fase het juiste gedrag van de HPLC-kolom ernstig kan beïnvloeden, dient deze een zo klein mogelijk percentage polaire groepen te bevatten (11). Men kan gebruik maken van in de handel verkrijgbare, met microdeeltjes gevulde, omgekeerde fasepakkingen of van voorgepakte kolommen. Tussen het injectiesysteem en de analytische kolom kan een voorkolom worden geïnstalleerd.

Mobiele fase

Methanol en water, beide van HPLC-kwaliteit, worden gebruikt als elutiemiddel, dat voor gebruik wordt ontgast. Isokratische elutie dient te worden toegepast. Men moet methanol/water-verhoudingen met minimaal 25 % watergehalte gebruiken, normaliter neemt men een 3 :1 (v/v) methanol/watermengsel om verbindingen met een log P van 6 binnen het uur te elueren, bij een stroomsnelheid van 1 ml/minuut. Voor verbindingen met een hoge log P kan het noodzakelijk zijn om de elutietijd te verkorten (evenals voor de referentiestoffen) door de polariteit van de mobiele fase of de kolomlengte te verminderen.

Stoffen met een zeer lage oplosbaarheid in *n*-octanol geven met de HPLC-methode veel al abnormaal lage log P_{ow} -waarden; de pieken van dergelijke stoffen vallen soms samen met het oplosmiddelfront. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat het verdelingsproces te traag verloopt om het evenwicht te bereiken binnen de tijdsduur die normaal voor een HPLC-scheiding nodig is. Het kan dan nuttig zijn om de stroomsnelheid en/of de methanol/water-verhouding te verlagen ten einde een betrouwbare waarde te verkrijgen.

Test- en referentiestoffen moeten in voldoende concentratie oplosbaar zijn in de mobiele fase om detectie mogelijk te maken. Alleen in uitzonderingsgevallen mogen additieven in het methanol/water-mengsel worden gebruikt, daar toevoegingen de eigenschappen van de kolom veranderen. Voor chromatogrammen met additieven is het verplicht een aparte kolom van hetzelfde type te gebruiken. Als methanol/water niet voldoet, mogen andere organisch-oplosmiddel/water-mengsels worden gebruikt, bij voorbeeld ethanol/water of acetonitril/water.

De pH van het eluent is kritisch voor ioniseerbare stoffen. Hij moet in het juiste pH-bereik van de kolom liggen, gewoonlijk tussen 2 en 8. Bufferen wordt aangeraden. Voorzichtigheid dient in acht te worden genomen om neerslag van zout en achteruitgang van de kolom te voorkomen, hetgeen optreedt met sommige organische fase/buffer-mengsels. HPLC-metingen met stationaire fasen op basis van silica boven pH 8 worden afgeraden omdat het gebruik van een alkalische mobiele fase kan leiden tot een snelle achteruitgang van de kolomeigenschappen.

Opgeloste stoffen

De referentiestoffen dienen zo zuiver mogelijk te zijn. Verbindingen voor test- of ijkdoeleinden worden, indien mogelijk, opgelost in de mobiele fase.

Testomstandigheden

De temperatuur gedurende de metingen mag niet meer variëren dan ± 2 K.

1.6.3.2. Meting

Berekening van de dode tijd t_0

De dode tijd t_0 kan bepaald worden met of wel een homologe serie (bij voorbeeld *n*-alkylmethylketonen) of wel organische stoffen die niet worden tegengehouden (bij voorbeeld thioureum of formamide). Ter berekening van de dode tijd t_0 met een homologe serie moet een set van ten minste 7 stoffen uit dezelfde serie worden geïnjecteerd en moeten de respectieve retentietijden worden bepaald. De ruwe retentietijden $t_{r(n_c+1)}$ worden uitgezet als functie van $t_{r(n_c)}$, en het snijpunt *a* en de helling *b* van de regressievergelijking:

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

worden bepaald (n_c = aantal koolstofatomen). De dode tijd t_0 wordt dan gegeven door:

$$t_0 = a / (1 - b)$$

Ijklijn

De volgende stap bestaat uit het construeren van een correlatiekromme van log *k*-waarden tegen log *P* voor geschikte referentiestoffen. In de praktijk wordt een set van 5 tot 10 standaard-referentiestoffen, met een log *P*-waarde rond het te verwachten bereik, tegelijkertijd geïnjecteerd en worden de retentietijden bepaald, bij voorkeur met een

recorder/integrator die is verbonden met het detectiesysteem. De corresponderende logaritmen van de capaciteitsfactoren, $\log k$, worden berekend en uitgezet als functie van $\log P$, bepaald met de schudflesmethode. De ijking wordt uitgevoerd met regelmatige tussenpozen, minstens eenmaal per dag, zodat rekening kan worden gehouden met mogelijke veranderingen in het gedrag van de kolom.

Bepaling van de capaciteitsfactor van de te onderzoeken stof

De teststof wordt in een zo klein mogelijke hoeveelheid van de mobiele fase geïnjecteerd. De retentietijd wordt bepaald (in duplo), om zo de capaciteitsfactor k te kunnen berekenen. Uit de correlatiegrafiek van de ijkstoffen kan de verdelingscoëfficiënt van de teststof worden geïnterpoleerd. Voor zeer lage en zeer hoge verdelingscoëfficiënten is extrapolatie noodzakelijk. In deze gevallen dient men extra aandacht te besteden aan de betrouwbaarheids grenzen van de regressielijn.

2. GEGEVENS

Schudflesmethode

De betrouwbaarheid van de gevonden waarden voor P kan worden onderzocht door de gemiddelden van de duplo-bepalingen te vergelijken met het totale gemiddelde.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);
- indien de methoden niet toepasbaar zijn (bij voorbeeld oppervlakteactieve stoffen), dient een berekende waarde of een schatting gebaseerd op de individuele oplosbaarheid in *n*-octanol en water te worden opgegeven;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, met name gegevens met betrekking tot verontreinigingen en de fysische toestand van de onderzochte stof.

Voor de schudflesmethode

- het resultaat van de inleidende schatting, indien van toepassing;
- testtemperatuur;
- gegevens over de analytische procedures voor bepaling van de concentraties;
- tijd en snelheid van centrifugeren, indien van toepassing;
- de gemeten concentraties in beide fasen voor elke bepaling (dit betekent dat in totaal 12 concentraties worden vermeld);
- het gewicht van de onderzochte stof, het volume van elke fase in elk testvat en de berekende totale hoeveelheid van de onderzochte stof in elke fase bij evenwicht;
- de berekende waarden van de verdelingscoëfficiënt (P) en het gemiddelde voor iedere groep testomstandigheden, evenals het gemiddelde van alle metingen; indien er aanwijzingen zijn dat de verdelingscoëfficiënt afhankelijk is van de concentratie, dient dit te worden vermeld in het testrapport;
- de standaardafwijking van de afzonderlijke P -waarden ten opzichte van het gemiddelde;
- de logaritme (grondtal 10) van de P -waarde gemiddeld over alle metingen;
- de theoretisch berekende waarde van P_{ov} , wanneer deze is bepaald of wanneer de gemeten waarde groter is dan 10^4 ;
- pH van het gebruikte water en van de waterfase tijdens het experiment;
- indien bufferoplossingen worden gebruikt, de redenen voor het gebruik van bufferoplossingen in plaats van water, samenstelling, concentratie en pH van de bufferoplossingen, pH van de waterige fase voor en na het experiment.

Voor de HPLC-methode

- het resultaat van de inleidende schatting, indien van toepassing;
- test- en referentiestoffen, en de zuiverheid;
- testtemperatuur;
- de pH waarbij de bepaling wordt uitgevoerd;
- details van de analytische en de voorkolom, de mobiele fase en de detectiemethode;
- retentiegegevens en $\log P$ -waarden uit de literatuur voor de bij de ijking gebruikte referentiestoffen;
- details van de gevonden regressielijn ($\log k$ tegen $\log P$);
- gemiddelde retentiegegevens en de geïnterpoleerde $\log P$ -waarde voor de teststof;
- beschrijving van de apparatuur en de werkomstandigheden;
- elutieprofielen;
- de hoeveelheden test- en referentiestoffen die in de kolom zijn gebracht;
- dode tijd en hoe hij gemeten werd.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107—Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) C. Hansch en A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medicinal Chemistry Project, 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundström en K. Sundh-Nygaard, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- (5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt en R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.
- (6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- (7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- (8) J.E. Haky en A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.
- (9) S. Fujisawa en E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
- (10) O. Juber mann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1958), Band 1/1, 223-339.
- (11) R.F. Rekker en H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.
- (12) A. Leo, C. Hansch en D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (14) NF T 20-043 (AFNOR) (Sept.1985). Chemical products for industrial use—Determination of partition coefficient—Flask shaking method.
- (15) C.V. Eadsforth en P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

- (16) A. Leo, C. Hansch en D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.
 (17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani en E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
 (18) W.B. Neely, D.R. Branson en G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.
 (19) D.S. Brown en E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.
 (20) J.K. Seydel en K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.
 (21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 (22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.
 (23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy en P.J. Taylor, J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Aanhangsel I

Berekenings-/Schattingsmethoden

INLEIDING

Een algemene inleiding tot berekeningsmethoden, gegevens en voorbeelden worden gegeven in het « Handbook of Chemical Property Estimation Methods » (a).

Berekende waarden voor P_{ow} kunnen worden gebruikt :

- om te beslissen welke van de experimentele methoden het meest geschikt is (schudflesbereik : $\log P_{ow} - 2$ tot 4, HPLC-bereik : $\log P_{ow} : 0$ tot 6);
- om de geschikte testvoorwaarden te kunnen kiezen (bij voorbeeld referentiestoffen voor de HPLC-methode, *n*-octanol/water-volume verhoudingen voor de schudflesmethode);
- ter controle voor het laboratorium zelf van eventuele fouten in het experiment;
- om een P_{ow} -schatting te leveren in die gevallen waar de experimentele methoden om technische redenen niet kunnen worden toegepast.

SCHATTINGSMETHODE

Inleidende schatting van de verdelingscoëfficiënt

De waarde van de verdelingscoëfficiënt kan geschat worden met behulp van de oplosbaarheid van de teststof in zuivere oplosmiddelen.

Hiervoor geldt :

$$P_{\text{geschat}} = \frac{c_{n\text{-Oktanol verzadigd}}}{c_{\text{water verzadigd}}}$$

BEREKENINGSMETHODEN

Principe van de berekeningsmethoden

Alle berekeningsmethoden zijn gebaseerd op de formele fragmentatie van het molecuul in geschikte substructuren, waarvoor betrouwbare $\log P_{ow}$ -fragmentconstanten bekend zijn. De $\log P_{ow}$ van het volledige molecuul wordt dan berekend als de som van de afzonderlijke waarden van de overeenkomstige fragmenten, plus de som van de correctietermen voor intramoleculaire wisselwerkingen.

Lijsten van fragmentconstanten en correctietermen zijn te vinden in de literatuur (b) (c) (d) (e). Sommige hiervan worden regelmatig bijgewerkt (b).

Kwaliteitscriteria

Over het algemeen vermindert de betrouwbaarheid van een berekeningsmethode met het toenemen van de complexiteit van de onderzochte stof. Voor eenvoudige moleculen met laag molecuulgewicht en slechts één of twee functionele groepen kan een afwijking van 0,1 tot 0,3 $\log P_{ow}$ -eenheden worden verwacht tussen de resultaten van de verschillende fragmentatiemethoden en de gemeten waarde. Voor meer complexe moleculen kan de fout groter zijn. Dit is afhankelijk van de betrouwbaarheid en beschikbaarheid van fragmentconstanten, alsmede van het vermogen om intramoleculaire wisselwerkingen (bij voorbeeld waterstofbruggen) te herkennen en het juiste gebruik van de correctietermen (minder problematisch met de computersoftware CLOGP-3) (b). In geval van ioniserende verbindingen is het belangrijk de lading of de mate van ionisatie juist in te schatten.

Berekeningsprocedures*Hansch π -methode*

De oorspronkelijke hydrofobesubstitutieconstante π , geïntroduceerd door Fujita et al. (f), wordt gedefinieerd als:

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

waarin $P_{ow}(\text{PhX})$ de verdelingscoëfficiënt van een aromatisch derivaat is, en $P_{ow}(\text{PhH})$ die van de oorspronkelijke verbinding,

$$\begin{aligned} \text{(bij voorbeeld } \pi_{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 = 0,71). \end{aligned}$$

Volgens zijn definitie is de Π -methode voornamelijk toepasbaar op aromatische substitutie. De Π -waarden van een groot aantal substitutiegroepen zijn in tabellen terug te vinden (b)(c)(d). Deze worden gebruikt voor de berekening van $\log P_{ow}$ van aromatische moleculen of substructuren.

Rekker-Methode

Volgens Rekker (g) wordt de $\log P_{ow}$ -waarde als volgt berekend:

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

waarin f_i de moleculaire fragmentconstante voorstelt en a_i de frequentie van het voorkomen ervan in het onderzochte molecuul. De correctietermen kunnen worden uitgedrukt als een integraal veelvoud van één enkele constante c_m (de zogenaamde „magische” constante). De fragmentconstanten f_i en c_m werden bepaald uit een lijst van 1 054 experimentele P_{ow} waarden (825 stoffen) met behulp van meervoudige regressieanalyse (c)(h). De bepaling van de interactietermen wordt uitgevoerd volgens vaste regels beschreven in de literatuur (e)(h)(i).

Hansch-Leo-methode

Volgens Hansch en Leo (c) wordt de $\log P_{ow}$ -waarde berekend uit:

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

waarin f_i de moleculaire fragmentconstante voorstelt, F_j de correctietermen en a_i en b_j het overeenkomstige aantal keren dat ze voorkomen. Afgeleid uit experimentele P_{ow} -waarden werd door „trial and error” een lijst gemaakt van atoom- en groeps-fragmentwaarden evenals een lijst van correctietermen F_j (de zogenaamde „factoren”). De correctietermen zijn geclassificeerd in verschillende categorieën (a)(c). Omdat het vrij ingewikkeld en tijdrovend is rekening te houden met alle regels en correctietermen, werden softwarepakketten ontwikkeld (b).

Gecombineerde methode

De berekening van $\log P_{ow}$ van complexe moleculen kan aanzienlijk verbeterd worden, indien het molecuul wordt opgesplitst in grotere substructuren waarvoor betrouwbare $\log P_{ow}$ -waarden beschikbaar zijn, hetzij uit tabellen (b)(c) of uit eigen metingen. Zulke fragmenten (bij voorbeeld heterocyclische structuren, antrachinon, azobenzeen) kunnen dan worden gecombineerd met de π -waarden volgens Hansch of met de fragmentconstanten volgens Rekker of Leo.

Opmerkingen

i) De berekeningsmethoden kunnen slechts worden toegepast op gedeeltelijk of volledig geïoniseerde stoffen wanneer de mogelijkheid bestaat om de nodige correctiefactoren in de berekening te verwerken.

ii) Als het bestaan van intramoleculaire waterstofbruggen kan worden aangenomen, moeten de overeenkomstige correctietermen (ongeveer + 0,6 tot + 1,0 $\log P_{ow}$ -eenheden) bij het resultaat worden opgeteld (a). Aanwijzingen voor de aanwezigheid van waterstofbruggen kunnen worden verkregen uit ruimtelijke modellen of spectroscopische gegevens over het molecuul.

iii) Als verschillende tautomere vormen mogelijk zijn, dient de meest waarschijnlijke vorm gebruikt te worden voor de berekening.

iv) De herzieningen van lijsten met fragmentconstanten dienen zorgvuldig gevolgd te worden.

Rapport

Bij het gebruik van berekenings-/schattingmethoden dient het testrapport zo mogelijk de volgende gegevens te bevatten :

- beschrijving van de stof (mengsel, verontreinigingen, enz.);
- aanwijzingen over mogelijke intramoleculaire waterstofbruggen, dissociatie, lading en alle andere ongewone effecten (bij voorbeeld tautomerie);
- beschrijving van de berekeningsmethode;
- identificatie of leverancier van de database;
- bijzonderheden in de keuze van de fragmenten;
- uitgebreide documentatie van de berekening.

LITERATUUR

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

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

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

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

(e) R.F. Rekker en H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.—Chim. Ther., 1979, vol. 14, 479.

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

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

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

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

Aanhangsel 2

Aanbevolen referentiestoffen voor de HPLC-methode

Nr.	Referentiestof	log P _{ow}	pKa
1	2-Butanon	0,3	
2	4-Acetylpyridine	0,5	
3	Aniline	0,9	
4	Acetanilide	1,0	
5	Benzylalcohol	1,1	
6	<i>p</i> -Methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxyazijnzuur	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenylacetonitril	1,6	
12	4-Methylbenzylalcohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoëzuur	1,8	pKa = 3,47
16	4-Chlooraniline	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzeen	1,9	
18	Cinnamylalcohol	1,9	
19	Benzoëzuur	1,9	pKa = 4,19
20	<i>p</i> -Kresol	1,9	pKa = 10,17
21	Kaneelzuur	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisool	2,1	
23	Methylbenzoaat	2,1	
24	Benzeen	2,1	
25	3-Methylbenzoëzuur	2,4	pKa = 4,27
26	4-Chloorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Trichloorethyleen	2,4	
28	Atrazine	2,6	
29	Ethylbenzoaat	2,6	
30	2,6-Dichloorbenzonitril	2,6	
31	3-Chloorbenzoëzuur	2,7	pKa = 3,82
32	Tolueen	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Dichlooraniline	2,8	
35	Chloorbenzeen	2,8	
36	Allylfenylether	2,9	
37	Broombenzeen	3,0	
38	Ethylbenzeen	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	<i>p</i> -Fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Thymol	3,3	
42	1,4-Dichloorbenzeen	3,4	
43	Difenylamine	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleen	3,6	
45	Fenylbenzoaat	3,6	
46	Isopropylbenzeen	3,7	
47	2,4,6-Trichloorfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenylyl	4,0	
49	Benzylbenzoaat	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-sec-butylfenol	4,1	
51	1,2,4-Trichloorbenzeen	4,2	
52	Dodecaancarbonsuur	4,2	
53	Difenylether	4,2	
54	<i>n</i> -Butylbenzeen	4,5	
55	Fenanthreen	4,5	
56	Fluorantheen	4,7	
57	Dibenzyl	4,8	
58	2,6-Difenylpyridine	4,9	
59	Trifenylamine	5,7	
60	DDT	6,2	
Andere referentiestoffen met lage log P _{ow}			
1	Nicotinezuur	-0,07	

A.9. VLAMPUNT

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Alvorens de test uit te voeren is het nuttig te beschikken over oriënterende gegevens inzake de brandbaarheid van de stof. De testprocedure is van toepassing op vloeistoffen waarvan de dampen door een ontstekingsbron tot ontbranding kunnen worden gebracht. De hier beschreven testmethoden zijn alleen betrouwbaar indien de gemeten waarde van het vlampunt binnen een bereik ligt zoals in de afzonderlijke methoden is aangegeven.

Bij het selecteren van de te gebruiken methode dient rekening te worden gehouden met mogelijke chemische reacties tussen de teststof en het monstervat.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het vlampunt is de laagste temperatuur, gecorrigeerd tot een druk van 101,325 kPa, waarbij een vloeistof onder de beschreven omstandigheden zodanig verdampt, dat in het testvat een brandbaar mengsel van lucht en damp wordt gevormd.

Eenheden : °C

$$t = T - 273,15$$

(t in °C en T in K).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Referentiestoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om regelmatig de werking van de methode te controleren en om vergelijkingen met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt in een testvat gebracht en verwarmd of gekoeld tot de testtemperatuur volgens de procedure beschreven bij de afzonderlijke testmethode. Ontstekingspogingen worden uitgevoerd om te zien of het monster al dan niet tot ontbranding kan worden gebracht bij de testtemperatuur.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

1.5.1. Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid varieert met de gemeten waarde van het vlampunt en met de gebruikte testmethode maximaal 2 °C.

1.5.2. Gevoeligheid

De gevoeligheid is afhankelijk van de gebruikte testmethode.

1.5.3. Toepasbaarheid

De toepasbaarheid van een aantal testmethoden blijft beperkt tot bepaalde vlampuntbereiken en afhankelijk van stofeigenschappen (bij voorbeeld hoge viscositeit).

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Een monster van de te onderzoeken stof wordt in een testapparaat overeenkomstig 1.6.3.1, respectievelijk 1.6.3.2, gebracht.

Uit veiligheidsoverwegingen wordt aangeraden voor energetische of giftige stoffen een methode waarbij slechts een klein monstervolume (circa 2 cm³) nodig is, toe te passen.

1.6.2. Testomstandigheden

Het apparaat dient, voor zover de veiligheid dit toelaat, op een tochtvrije plaats te worden opgesteld.

1.6.3. Uitvoering van de test

1.6.3.1. Evenwichtsmethode

Zie ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 en ISO 3679.

1.6.3.2. Niet-evenwichtsmethode

Apparatuur van Abel :

Zie BS 2000-170, NF M 07-011 en NF T 66-009.

Apparatuur van Abel-Pensky :

Zie EN 57, DIN 51755, deel 1 (voor temperaturen van 5 tot 65 °C) DIN 51755, deel 2 (voor temperaturen lager dan 5 °C), NF M 07-036.

Apparatuur van Tag :

Zie ASTM D 56.

Apparatuur van Pensky-Martens :

Zie ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 en NF M 07-019.

Opmerkingen :

Indien het vlampunt, bepaald volgens een van de niet-evenwichtsmethoden onder 1.6.3.2, de volgende waarden blijkt te hebben : 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C, 55 ± 2 °C, dient dit te worden bevestigd volgens een evenwichtsmethode met gebruik van dezelfde apparatuur.

Alleen de methoden waarmee de temperatuur van het vlampunt kan worden bepaald, komen in aanmerking voor gebruik ten behoeve van een kennisgeving.

Voor de bepaling van het vlampunt van visceuse vloeistoffen (verven, lijmen, e.d.) die oplosmiddelen bevatten, mag uitsluitend gebruik worden gemaakt van apparatuur en testmethoden die geschikt zijn voor bepaling van het vlampunt van visceuse vloeistoffen.

Zie ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 en DIN 53213, deel 1.

2. GEGEVENS

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- nauwkeurige beschrijving van de stof (beschrijving en verontreinigingen);
- de gebruikte testmethode alsmede eventuele wijzigingen;
- de resultaten en alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. LITERATUUR

Geen.

A.10. ONTVLAMBAARHEID (VASTE STOFFEN)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Alvorens de test uit te voeren is het nuttig te beschikken over oriënterende gegevens inzake potentieel explosieve eigenschappen van de stof.

Deze test dient alleen te worden toegepast op stoffen in poeder-, korrel- of pastavorm.

Alleen stoffen waarvan de brandsnelheid hoger is dan een bepaalde drempelwaarde, worden als licht ontvlambaar beschouwd. Daarom worden niet alle stoffen die kunnen worden ontstoken, maar alleen die stoffen die snel branden of waarvan het brandgedrag buitengewoon gevaarlijk is, inbegrepen.

Het is buitengewoon gevaarlijk indien een smeulproces zich voortplant door een metaalpoeder, vanwege de moeilijkheid om het vuur te doven. Daarom dienen metaalpoeders als licht ontvlambaar te worden beschouwd, als de smeulhaard zich binnen een zekere tijd door de gehele massa kan voortplanten.

1.2. DEFINITIE EN EENHEDEN

Brandtijd in seconden.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gekozen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Van de stof wordt een ononderbroken rups of poederlijn met een lengte van ongeveer 250 mm gevormd waarop een oriënterende proef wordt uitgevoerd om te bepalen of, na ontsteken van het monster met behulp van een gasvlam, de vlam of het smeulproces zich voortplant. Als het vlamfront/smeulproces zich binnen een bepaalde tijdsduur over 200 mm van de sliert voortplant, dient een volledig testprogramma te worden uitgevoerd om de brandsnelheid vast te stellen.

1.5. KWALITEITSCRITEARIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Oriënterende proef

Van de stof wordt een ononderbroken rups of poederlijn van ongeveer 250 mm lengte, 20 mm breedte en 10 mm hoogte gevormd op een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende grondplaat.

Een hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm) wordt gedurende maximaal 2 minuten bij één uiteinde van de rups gehouden totdat het poeder ontbrandt (5 minuten voor metaalpoeders of metaallegeringen). Men dient er op te letten of de ontbranding zich binnen 4 minuten (of 40 minuten bij metaalpoeders) voortplant over 200 mm van de poederrups. Indien de stof niet ontbrandt of indien de vlam of het smeulproces zich niet binnen 4 minuten (of 40 minuten bij metaalpoeders) voortplant over 200 mm poederrups dient de stof niet als licht ontvlambaar te worden beschouwd en heeft geen verder onderzoek te worden uitgevoerd. Als het brandproces zich in minder dan 4 minuten, of minder dan 40 minuten bij metaalpoeders, voortplant over 200 mm van de poederrups dient de procedure zoals hieronder beschreven (punt 1.6.2. en volgende) te worden uitgevoerd.

1.6.2. Brandsnelheidstest

1.6.2.1. Voorbereidingen

Poeder of korrelvormige stoffen worden ingebracht (niet aandrukken) in een mal met een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een inwendige hoogte van 10 mm en een inwendige breedte van 20 mm. Om de zijanten te begrenzen zijn aan beide kanten van de mal in de lengterichting twee metalen platen gemonteerd die 2 mm uitsteken boven de rand van de driehoekige doorsnede (zie figuur). Vervolgens laat men de mal driemaal van een hoogte van 2 cm op een massief oppervlak vallen. Indien nodig wordt de mal bijgevuld.

Vervolgens worden de zijplaten verwijderd en wordt de overtollige stof met een stevig blad weggeveegd. Een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende plaat wordt bovenop de mal gelegd, het apparaat wordt omgekeerd, waarna de mal wordt verwijderd.

Pastavormige stoffen worden op een onbrandbare, niet-poreuze en slecht warmtegeleidende plaat aangebracht in de vorm van een rups met een lengte van 250 mm en een doorsnede van ongeveer 1 cm².

1.6.2.2. Testomstandigheden

Bij een vochtgevoelige stof dient de test zo snel als mogelijk na het verwijderen van de verpakking te worden uitgevoerd.

1.6.2.3. Uitvoering van de test

De rups wordt in een zuurkast geplaatst in een richting loodrecht op de richting van de trek.

De luchtsnelheid moet voldoende zijn om te verhinderen dat verbrandingsgassen naar de laboratoriumruimte ontsnappen; de luchtsnelheid mag gedurende de test niet veranderd worden. De apparatuur moet worden omgeven door een tocht scherm.

Met de hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm) wordt de rups aan één kant ontstoken. Nadat de rups over een lengte van 80 mm heeft gebrand, wordt de brandsnelheid over de volgende 100 mm gemeten. De test, waarbij steeds een schone koude plaat wordt gebruikt, wordt zesmaal uitgevoerd, tenzij eerder een positief resultaat wordt verkregen.

2. GEGEVENS

Voor de beoordeling zijn de brandduur in de oriënterende proef (1.6.1) en de kortste brandduur uit de hoogstens zes testen (1.6.2.3) van belang.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);
- een beschrijving van de fysische toestand en het vochtgehalte van de onderzochte stof;
- de resultaten van de oriënterende test en, indien uitgevoerd, de brandsnelheidstest;

— alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Poedervormige, korrelvormige of pastavormige stoffen worden als licht ontvlambaar beschouwd indien in één van de tests uitgevoerd volgens 1.6.2 de brandduur minder dan 45 seconden bedraagt. Poeders van metalen of metaallegeringen worden als licht ontvlambaar beschouwd, indien zij kunnen worden ontstoken en indien de vlam of reactiezone zich binnen 10 minuten over het gehele monster uitbreidt.

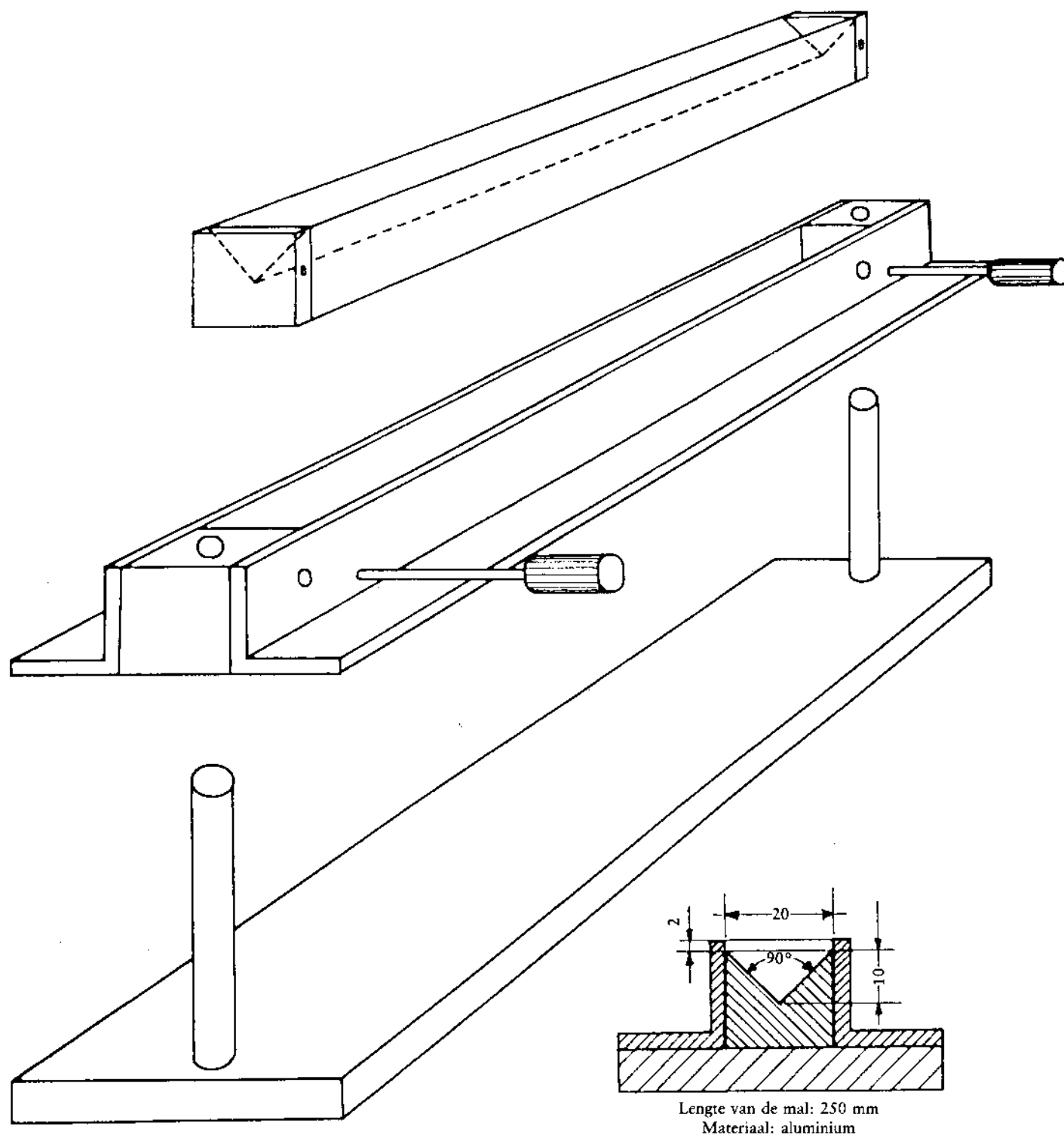
1. LITERATUUR

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

Aanhangsel

Figuur

Mal en toebehoren om een rups van de te onderzoeken stof te vormen (Afmetingen in mm)



A.11. ONTVLAMBAARHEID (GASSEN)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Met deze methode kan worden vastgesteld of mengsels van gassen en lucht bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) en atmosferische druk brandbaar zijn, en zo ja, binnen welk concentratiebereik. Mengsels met toenemende concentraties van het te onderzoeken gas in lucht worden blootgesteld aan een elektrische vonk, waarna wordt vastgesteld of ontbranding plaatsvindt.

1.2. DEFINITIE EN EENHEDEN

De maat voor de brandbaarheid is het bereik van de concentratiewaarden tussen de onderste en bovenste ontploffingsgrens. De onder- en bovenexplosiegrenzen worden gevormd door de uiterste concentraties van het brandbare gas in lucht waarbij een vlam zich niet voortplant.

1.3. REFERENTIESTOF

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De concentratie van het gas in de lucht wordt stap voor stap opgevoerd, waarbij het mengsel in iedere stap wordt blootgesteld aan een elektrische vonk.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Apparatuur**

Het testvat is een staande glazen cilinder met een inwendige diameter van minimaal 50 mm en een hoogte van minimaal 300 mm. De ontstekings elektroden bevinden zich op een onderlinge afstand van 3 tot 5 mm en worden 60 mm boven de cilinderbodem geplaatst. De cilinder is voorzien van een overdrukventiel. Het apparaat moet worden afgeschermd om schade bij een eventuele ontploffing te beperken.

Als ontstekingsbron wordt gebruik gemaakt van een staande inductievonk met een duur van 0,5 sec, opgewekt door een hoogspanningstransformator met een uitgangsspanning van 10 tot 15 kV (maximaal ingangsvermogen 300 W). Een voorbeeld van een geschikt apparaat wordt gegeven in referentie (2).

1.6.2. Testomstandigheden

De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.3. Uitvoering van de test

Met behulp van doseerpompen wordt een bekende concentratie van het gas in lucht naar de glazen cilinder geleid. Het mengsel wordt blootgesteld aan een vonk en er wordt vastgesteld of er zich vanaf de ontstekingsbron al dan niet een vlam ontwikkelt die zich zelfstandig voortplant. De gasconcentratie wordt in stappen van 1 % vol opgevoerd, totdat ontbranding zoals boven bedoeld, plaatsvindt.

Als de chemische structuur van het gas erop wijst dat het niet ontvlambaar is en de samenstelling van het stoichiometrische mengsel met lucht berekend kan worden, dienen alleen de mengsels in het bereik van 10 % beneden tot 10 % boven de stoichiometrische samenstelling getest te worden in stappen van 1 %.

2. GEGEVENS

Het enige gegeven van belang voor bepaling van deze eigenschap is het optreden van een vlam, die zich zelfstandig voortplant.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);
- een beschrijving van de gebruikte apparatuur inclusief de afmetingen;
- de temperatuur waarbij de test werd uitgevoerd;
- de onderzochte concentraties en de verkregen resultaten;
- het resultaat van de test : niet ontvlambaar of licht ontvlambaar gas. Indien geconcludeerd wordt dat het gas niet ontvlambaar is, moet het concentratiebereik waarover het gas in stappen van 1 % onderzocht werd, vermeld worden;
- alle gegevens en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten.

4. LITERATUUR

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

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grever, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker en H. Schacke. Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen. Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126-127.

A.12. ONTVLAMBAARHEID (CONTACT MET WATER)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Deze testmethode kan worden gebruikt om vast te stellen of de reactie van een stof met water of vochtige lucht leidt tot het vrijkomen van een gevaarlijke hoeveelheid van één of meer eventueel licht ontvlambare gassen.

De testmethode kan zowel op vaste als op vloeibare stoffen worden toegepast. Deze methode is niet van toepassing op stoffen die in aanraking met lucht spontaan ontbranden.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Licht ontvlambaar : Stoffen die bij aanraking met water of vochtige lucht licht ontvlambare gassen produceren met een minimum ontwikkelingshoeveelheid van 1 liter per kg stof per uur.

1.3. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt volgens de hieronder beschreven getrapte volgorde getest; als bij één van de stappen ontbranding optreedt, is verder onderzoek overbodig. Als bekend is dat de te onderzoeken stof niet heftig reageert met water kan worden verdergegaan met stap 4 (1.3.4).

1.3.1. Stap 1

De te onderzoeken stof wordt in een buis met gedistilleerd water op 20 °C gebracht en er wordt nagegaan of het vrijgekomen gas ontbrandt.

1.3.2. Stap 2

De te onderzoeken stof wordt gebracht op een filtreerpapier dat in een schotel met gedistilleerd water van 20 °C drijft, en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt. Het filtreerpapier dient alleen om de stof op één plaats te houden, waardoor de kans op ontbranding toeneemt.

1.3.3. Stap 3

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoog en 3 cm doorsnede gemaakt. Hierop worden een paar druppels water gebracht en er wordt nagegaan of het vrijkomende gas ontbrandt.

1.3.4. Stap 4

De te onderzoeken stof wordt met gedistilleerd water van 20 °C gemengd en de snelheid van gasontwikkeling wordt ieder uur gemeten gedurende een periode van 7 uur. Als de snelheid van de gasontwikkeling onregelmatig is of toeneemt tegen het eind van de periode van 7 uur, moet de duur van de meting tot maximaal 5 dagen worden verlengd. De test kan worden gestaakt zodra een snelheid hoger dan 1 liter/kg per uur wordt gemeten.

1.4. REFERENTIESTOF

Niet gegeven.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODEN**1.6.1. Stap 1****1.6.1.1. Testomstandigheden**

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.1.2. Uitvoering van de test

Een kleine hoeveelheid (ongeveer 2 mm doorsnede) van de te onderzoeken stof wordt in een bak met gedistilleerd water gebracht. Genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

1.6.2. Stap 2**1.6.2.1. Apparatuur**

Een filtreerpapier laat men plat op het oppervlak van een hoeveelheid gedistilleerd water drijven in een geschikt vat, bij voorbeeld een verdampingsschotel met een doorsnede van 100 mm.

1.6.2.2. Testomstandigheden

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C).

1.6.2.3. Uitvoering van de test

Een kleine hoeveelheid van de te onderzoeken stof (ongeveer 2 mm doorsnede) wordt midden op het filtreerpapier gebracht. Genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

1.6.3. Stap 3**1.6.3.1. Testomstandigheden**

De proef wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur ongeveer 20 °C).

1.6.3.2. Uitvoering van de test

Van de te onderzoeken stof wordt een hoopje van ongeveer 2 cm hoogte en 3 cm doorsnede gemaakt met een kuiltje bovenin. In het kuiltje worden een paar druppels water gebracht en genoteerd wordt (i) of er gas ontwijkt en (ii) of het gas spontaan ontbrandt. Indien ontbranding van het gas plaatsvindt, is verder onderzoek van de stof niet nodig, omdat de stof dan als gevaarlijk wordt beschouwd.

1.6.4. Stap 4**1.6.4.1. Apparatuur**

De apparatuur wordt opgesteld als in de figuur.

1.6.4.2. Testomstandigheden

Kijk of het vat van de te onderzoeken stof poeder bevat bestaande uit deeltjes van minder dan 500 µm diameter. Indien meer dan 1 gewichtsprocent van de stof poedervormig is of indien het monster brokkelig is, wordt de stof in zijn geheel vóór de test tot poeder gemalen; op deze manier wordt rekening gehouden met mogelijk verkleining van de deeltjesgrootte tijdens opslag en verwerking van de stof. In alle andere gevallen wordt de stof onderzocht zoals ze werd verkregen. De test moet worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) en atmosferische druk.

1.6.4.3. Uitvoering van de test

10 tot 20 ml water wordt in de druppeltrechter van het apparaat gebracht en 10 g van de te onderzoeken stof wordt afgewogen in de erlenmeyerkolf. Het volume van het vrijkomende gas kan op elke geschikte wijze worden gemeten. De kraan van de druppeltrechter wordt geopend zodat het water in de erlenmeyerkolf komt, en een chronometer gestart. De hoeveelheid vrijkomend gas wordt ieder uur gemeten gedurende een periode van 7 uur. Als tijdens deze periode het vrijkomen van gas onregelmatig verloopt, of als aan het eind van de periode de hoeveelheid vrijkomend gas toeneemt moeten de metingen voortgezet worden tot maximaal 5 dagen. Indien de gasontwikkelingssnelheid, tijdens de metingen, op welk ogenblik dan ook, meer dan 1 liter per kg stof en per uur bedraagt, kan het onderzoek gestaakt worden. De test moet in triplo worden uitgevoerd.

Indien de chemische identiteit van het gas niet bekend is, dient het te worden geanalyseerd. Indien het gas licht ontvlambare componenten bevat en niet bekend is of het totale mengsel licht ontvlambaar is, moet een mengsel van dezelfde samenstelling worden bereid en getest volgens methode A.11.

2. GEGEVENS

De onderzochte stof wordt als gevaarlijk beschouwd indien :

- spontane ontbranding plaatsvindt bij één van de stappen tijdens de testprocedure;
- een ontvlambaar gas vrijkomt met een grotere snelheid groter dan 1 liter per kg van de te onderzoeken stof per uur.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);
- gegevens over eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof;
- de resultaten van de tests (stappen 1, 2, 3 en 4);

- de chemische identiteit van het vrijgekomen gas;
- de snelheid waarmee het gas vrijkomt als stap 4 (1.6.4) wordt uitgevoerd;
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

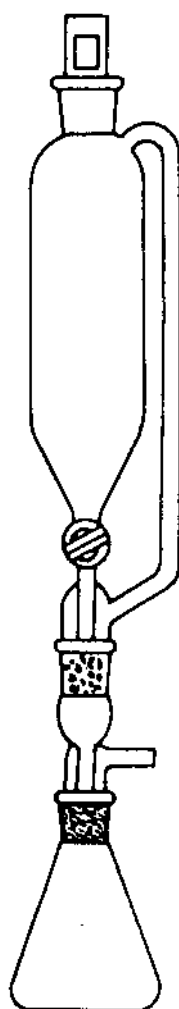
4. LITERATUUR

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Aanhangsel

Figuur

Apparatuur



A.13. PYROFORE EIGENSCHAPPEN VAN VASTE STOFFEN EN VLOEISTOFFEN**1. METHODE****1.1. Inleiding**

De testprocedure is van toepassing op vaste en vloeibare stoffen, die spontaan kunnen ontbranden kort nadat ze bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) in aanraking zijn gekomen met lucht.

Deze testprocedure is niet van toepassing op stoffen die bij kamertemperatuur eerst na uren- of dagenlange blootstelling aan lucht spontaan ontbranden of die op hogere temperatuur moeten worden gebracht om tot zelfontbranding te komen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Stoffen worden als pyrofoor beschouwd als ze ontbranden of verkoling veroorzaken onder de omstandigheden zoals beschreven onder 1.6.

Voor de zelfontvlambaarheid van vloeistoffen kan ook een test nodig zijn volgens methode A.15 : Zelfontbrandingstemperatuur (vloeistoffen en gassen).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof, vast of vloeibaar, wordt op een inerte drager gebracht en gedurende 5 minuten bij omgevingstemperatuur in aanraking gebracht met lucht. Indien vloeistoffen niet ontbranden moeten ze geabsorbeerd worden op filterpapier en gedurende 5 minuten bij omgevingstemperatuur (ongeveer 20 °C) worden blootgesteld aan lucht. Als een vaste of vloeibare stof ontbrandt, of een vloeistof het filterpapier doet ontbranden of verkolen, wordt de stof beschouwd als pyrofoor.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Reproduceerbaarheid : gezien het belang met betrekking tot veiligheid is één enkel positief resultaat voldoende om de stof als pyrofoor te beschouwen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Apparatuur**

Een porseleinen bakje van ongeveer 10 cm doorsnede wordt bij kamertemperatuur (ongeveer 20 °C) tot een hoogte van ongeveer 5 mm gevuld met diatomeeënaarde.

Opmerking :

Diatomeeënaarde of een vergelijkbare en gangbare inerte stof wordt representatief geacht voor aarde waarmee gemorste stoffen in geval van een ongeluk in aanraking kunnen komen.

Droog filterpapier is vereist om vloeistoffen te onderzoeken die niet ontbranden na aanraking met lucht wanneer ze in aanraking zijn met een inerte drager.

1.6.2. Uitvoering van de test**a) Poedervormige vaste stoffen**

1 tot 2 cm³ van de te onderzoeken, poedervormige stof wordt vanaf ongeveer 1 m hoogte op een niet-brandbaar oppervlak gestrooid; nagegaan wordt of de stof tijdens het vallen, of binnen 5 minuten na het neerkomen, ontbrandt.

De proef wordt 6 keer uitgevoerd tenzij ontbranding optreedt.

b) Vloeistoffen

Ongeveer 5 cm³ van van de te onderzoeken vloeistof wordt in het porseleinen bakje gegoten en nagegaan wordt of de stof binnen 5 minuten ontbrandt.

Als geen ontbranding optreedt tijdens de zes proeven, voer dan de volgende tests uit :

Een hoeveelheid van 0,5 ml van de te onderzoeken stof wordt met behulp van een injectiespuit op een gekarteld filterpapiertje gebracht en er wordt nagegaan of ontbranding of verkoling van het filterpapier optreedt binnen vijf minuten nadat de vloeistof werd aangebracht. De test wordt driemaal uitgevoerd, tenzij ontbranding of verkoling optreedt.

2. GEGEVENS**2.1. BEWERKING VAN DE RESULTATEN**

Het onderzoek mag worden gestaakt zodra een positief resultaat optreedt in één van de tests.

2.2. BEOORDELING

Indien de stof ontbrandt binnen vijf minuten na opbrengen op een inerte drager en blootstelling aan de lucht, of indien een vloeistof een filterpapiertje verkoolt of doet ontbranden binnen vijf minuten na opbrengen en blootstelling aan de lucht, wordt de stof beschouwd als zijnde pyrofoor.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- een nauwkeurige specificatie van de stof (beschrijving en verontreinigingen);
- de resultaten van de tests;
- iedere bijkomende opmerking betreffende de interpretatie van de resultaten.

4. LITERATUUR

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

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

A.14. EXPLOSIEGEVAAR**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

De methode omvat een testschema om vast te stellen of een pasta explosiegevaar oplevert wanneer de stof aan een vlam (thermische gevoeligheid) of aan een schok of wrijving (mechanische gevoeligheid) wordt blootgesteld, alsmede of een vloeistof explosiegevaar oplevert wanneer de stof aan een vlam of aan een schok wordt blootgesteld.

De methode bestaat uit drie delen :

- a) een test voor de thermische gevoeligheid (1);
- b) een test voor de mechanische gevoeligheid bij schokken (1);
- c) een test voor de mechanische gevoeligheid bij wrijving (1).

De methode levert gegevens op waarmee de kans op ontstaan van een explosie door bepaalde veel voorkomende stimuli kan worden beoordeeld. De methode is niet bedoeld om vast te stellen of een stof onder om het even welke omstandigheden kan exploderen.

De methode is geschikt om te bepalen of een stof explosiegevaar oplevert (thermische en mechanische gevoeligheid) onder omstandigheden zoals beschreven in het besluit. De methode is gebaseerd op een aantal soorten apparaten die internationaal op grote schaal worden gebruikt (1) en die doorgaans zinvolle resultaten geven. Erkend wordt dat de methode geen definitief uitsluitsel geeft. Andere apparatuur dan beschreven, mag worden gebruikt op voorwaarde dat deze internationaal erkend is en dat de resultaten afdoende getoetst kunnen worden aan de resultaten met de beschreven apparatuur.

De proeven hoeven niet te worden uitgevoerd indien uit de beschikbare thermodynamische gegevens (vormingswarmte, ontledingswarmte) en/of afwezigheid van bepaalde reactieve groepen (2) in de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet snel kan ontleden onder productie van gassen of warmte (dat wil zeggen: het materiaal vertegenwoordigt geen enkel explosiegevaar). Een test op mechanische gevoeligheid voor wrijving is niet vereist voor vloeistoffen.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Als explosief worden gedefinieerd : stoffen die door de werking van een vlam kunnen ontploffen of die gevoelig zijn voor schokken en wrijving in de beschreven apparatuur (of die mechanisch gevoeliger zijn dan 1,3-dinitrobenzeen in andere apparatuur).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Technisch, kristallijn 1,3-dinitrobenzeen gezeefd door 0,5 mm maaswijdte, voor de wrijvings- en schokmethode.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX, hexogeen, cycloniet — CAS 121-82-4), geherkristalliseerd uit waterig cyclohexanon, nat gezeefd door een 250 µm zeef en op een 150 µm zeef en gedroogd bij 103 ± 2 °C (gedurende 4 uur) voor de tweede reeks wrijvings- en schoktests.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Tot vaststelling van veilige omstandigheden voor het uitvoeren van de drie gevoeligheidstests zijn oriënterende proeven noodzakelijk.

1.4.1. Oriënterende proef (3)

Om veiligheidsredenen worden voor het uitvoeren van de gevoeligheidsbeproevingen zeer kleine monsters (ongeveer 10 mg) van de stof zonder afsluiting verwarmd in een gasvlam, blootgesteld aan schokken in een geschikt apparaat, en aan wrijving door middel van een hamer tegen een aambeeld of door middel van elk ander wrijvingstoestel. Het doel is vast te stellen of de stof zo gevoelig en explosiegevaarlijk is dat de voorgeschreven gevoeligheidstests, vooral die van thermische gevoeligheid, moeten worden uitgevoerd met speciale voorzorgen om aldus te voorkomen dat de onderzoeker gewond kan raken.

1.4.2. Thermische gevoeligheid

Bij deze methode wordt de stof verwarmd in een stalen buis, afgesloten door afsluitplaten met openingen van verschillende doorsnede, om vast te stellen of de stof bij thermische belasting en goed gedefinieerde opsluiting kan ontploffen.

1.4.3. Mechanische gevoeligheid (schok)

Bij deze methode wordt de stof aan een schok, veroorzaakt door een bepaalde massa vallend vanaf een bepaalde hoogte, onderworpen.

1.4.4. Mechanische gevoeligheid (wrijving)

Bij deze methode wordt de vaste stof of pasta onder bepaalde omstandigheden van belasting en relatieve beweging onderworpen aan wrijving tussen standaardoppervlakken.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODEN

1.6.1. Thermische gevoeligheid (werking van een vlam)

1.6.1.1. Apparatuur

Het apparaat bestaat uit een stalen buis, bestemd voor éénmalig gebruik, voorzien van een herbruikbare afsluitinrichting (figuur 1), die in een verwarmings- en beschermingstoestel wordt geplaatst. Elke buis is diep getrokken uit plaatstaal (zie aanhangsel) en heeft een inwendige doorsnede van 24 mm, een lengte van 75 mm en een wanddikte van 0,5 mm. Aan het open einde is de buis van een flens voorzien om afsluiting met de afsluitinrichting mogelijk te maken. De afsluitinrichting bestaat uit een drukbestendige ronde afsluitplaat met een gat in het midden, die met behulp van een tweedelige schroefverbinding (moer en kraag met schroefdraad) stevig op de buis wordt bevestigd. De moer en de kraag zijn gemaakt van chroommangaanstaal (zie aanhangsel) dat tot 800 °C vonkvrij is. De afsluitplaten zijn 6 mm dik en gemaakt van hittebestendig staal (zie aanhangsel), en zijn verkrijgbaar in een reeks verschillende openingsmaten.

1.6.1.2. Testomstandigheden

Normaal wordt de stof getest zoals hij verkregen werd, alhoewel het in sommige gevallen noodzakelijk kan zijn om de stof te testen na verpulvering, bij voorbeeld indien hij geperst, gegoten of op andere wijze verdicht is.

Voor vaste stoffen wordt de hoeveelheid voor elke test te gebruiken materiaal bepaald met behulp van een twee-staps vulprocedure. Een gewogen buis wordt gevuld met 9 cm^3 van de stof, waarna deze wordt aangedrukt met een kracht van 80 N verdeeld over de hele doorsnede van de buis. Om veiligheidsredenen of in gevallen waar de fysische vorm van het monster kan veranderen onder druk, mogen andere vulmethoden worden gebruikt; aandrukken is bij voorbeeld niet geschikt als de stof zeer wrijvingsgevoelig is. Als de stof samendrukbaar is wordt meer materiaal bijgevoegd en aangepast met 80 N totdat de buis gevuld is tot op 55 mm van de bovenkant. De massa van de stof die gebruikt wordt om de buis te vullen tot op het niveau van 55 mm wordt bepaald, vervolgens worden nog twee porties met deze massa, en elk aangedrukt met een kracht van 80 N, ingebracht. Daarna wordt het materiaal of wel bijgevoeld of wel verwijderd en aangedrukt totdat de buis gevuld is tot op een hoogte van 15 mm van de bovenkant. Een tweede stap in de vulprocedure wordt uitgevoerd met een aangedrukte massa die een derde bedraagt van de totale hoeveelheid die in de eerste poging werd bepaald. Er worden nog twee van deze hoeveelheden toegevoegd en elk onder 80 N aangedrukt, waarna het niveau van de stof wordt aangepast tot op 15 mm van de bovenkant door materiaal naar behoefte toe te voegen of weg te halen. Voor elke beproeving wordt nu de hoeveelheid vaste stof gebruikt, die in de tweede vulprocedure is vastgesteld, waarbij het vullen wordt uitgevoerd met drie gelijke porties die achtereenvolgens worden samengeperst tot 9 cm^3 met de daartoe benodigde kracht (het samenpersen kan worden vereenvoudigd met behulp van tussenringen).

Vloeistoffen en gels worden in de buis gebracht tot op een hoogte van 60 mm, waarbij zorg dient te worden gedragen dat bij het vullen met gel geen luchtballen ontstaan. De buis wordt in de kraag geschoven, de juiste afsluitplaat wordt opgelegd en de moer wordt op de kraag geschroefd na het aanbrengen van een beetje smeermiddel op basis van molybdeendisulfide. Het is van essentieel belang te controleren dat er geen materiaal achterblijft tussen de moer, de plaat, en de schroefdraad.

De verwarming geschiedt met behulp van propaan uit een industriële cilinder voorzien van een drukregelaar (60 tot 70 mbar), dat via een meter door een verdeelstuk evenredig verdeeld wordt over vier branders (hetgeen visueel te controleren is aan de vlammen uit de branders). De branders worden rond de beproevingsruimte geplaatst zoals aangegeven in figuur 1. De vier branders hebben een gezamenlijk verbruik van ongeveer 3,2 liter propaan per minuut. Andere stookgassen of branders mogen gebruikt worden, maar de opwarmingsnelheid moet verlopen zoals in figuur 3 aangegeven. Voor alle apparatuur dient de opwarmingsnelheid periodiek gecontroleerd te worden met behulp van met dibutylftalaat gevulde buizen zoals in figuur 3 is aangeduid.

1.6.1.3. *Uitvoering van de proeven*

Elke test wordt uitgevoerd totdat ofwel de buis gefragmenteerd is of de buis gedurende vijf minuten is verhit. Als de test resulteert in fragmentatie van de buis in drie of meer stukken, die soms nog aan elkaar zijn verbonden door smalle metaalstrookjes zoals geïllustreerd in figuur 2, wordt het resultaat beoordeeld als een opgetreden explosie. Een testresultaat, waarbij minder of geen fragmenten ontstaan, wordt beschouwd als niet explosief.

Een reeks van drie proeven met een afsluitplaat met een opening van 6,0 mm doorsnede wordt uitgevoerd en, als geen explosies optreden, een tweede reeks van drie proeven met een afsluitplaat met een opening van 2,0 mm. Indien een explosie plaatsvindt in een van de twee proefreeksen, kunnen verdere tests achterwege blijven.

1.6.1.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als er een explosie plaatsvindt in een van bovenstaande testreeksen.

1.6.2. **Mechanische gevoeligheid (schok)**

1.6.2.1. *Apparatuur (figuur 4)*

De belangrijkste onderdelen van een doorsnee valhamerapparaat zijn een gietstalen blok met voet, aambeeld, kolom, geleiders, valgewichten, een ontkoppelinrichting en een monsterhouder. Op het stalen blok van 230 mm lengte x 250 mm breedte x 200 mm hoogte met een gegoten voet van 450 mm lengte x 450 mm breedte x 60 mm hoogte, zit het stalen aambeeld van 100 mm doorsnede x 70 mm hoogte vastgeschroefd. Aan de achterkant van het stalen blok is de houder geschroefd waarin de kolom, bestaande uit een naadloze getrokken stalen buis, is bevestigd. Vier schroeven verankeren het apparaat aan een massief betonnen blok van 60 x 60 x 60 cm in een zodanige positie dat de geleiderbalken volkomen verticaal staan en het valgewicht vrij kan vallen. Gewichten van 5 en 10 kg massief staal kunnen worden gebruikt. Het slagoppervlak van de gewichten bestaat uit getemperd staal, HRC 60 tot 63, met een minimumdoorsnede van 25 mm.

Het te onderzoeken monster wordt gevat in een schokbeproevingvat dat bestaat uit twee massieve, in het verlengde boven elkaar liggende stalen cilinders omhuld door een holle stalen geleidecilinder. De massief stalen cilinders hebben een doorsnede van 10 (- 0,003; - 0,005) mm en een hoogte van 10 mm, gepolijste oppervlakken, afgeronde zijvlakken (rondingsstraal 0,5 mm) en een hardheid van HRC 58 tot 65. De holle cilinder heeft een uitwendige diameter van 16 mm, een gepolijste binnenkant met een doorsnede van 10 (+0,005; +0,010) mm en een hoogte van 13 mm. Het beproevingsvat wordt vastgezet op een stalen tussenaambeeld (26 mm doorsnede en 26 mm hoogte) en wordt gecentreerd door een ring met perforaties via welke de explosiegassen kunnen worden afgevoerd.

1.6.2.2. *Testomstandigheden*

Het monstervolume dient 40 mm³ te bedragen of overeen te komen met het vulvolume in een alternatief apparaat. Vaste stoffen dienen in droge toestand te worden onderzocht en worden als volgt voorbereid :

a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef doorlaat, wordt voor de test gebruikt;

b) samengeperste, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden in stukken gebroken en gezeefd; de zeeffractie van 0,5 tot 1 mm doorsnede wordt gebruikt voor de test en dient representatief te zijn voor de oorspronkelijke stof.

Stoffen die normaal gezien geleverd worden als pasta's zouden, in de mate van het mogelijke, moeten worden getest in droge staat of, in ieder geval, na het zoveel mogelijk verwijderd hebben van vloeistof. Vloeistoffen worden onderzocht met een spleet van 1 mm tussen de bovenste en de onderste stalen cilinder.

1.6.2.3. *Uitvoering van de proeven*

Een reeks van zes proeven wordt uitgevoerd waarbij men het gewicht van 10 kg van een hoogte van 0,40 m (40 J) laat vallen. Indien een explosie wordt verkregen in de reeks met 40 J moet een extra reeks van zes proeven worden uitgevoerd waarbij men 5 kg van 0,15 m (7,5 J) laat vallen. In andere apparaten wordt het monster vergeleken met de gekozen referentiestof via een vastgestelde procedure (bij voorbeeld op-en-neer techniek, enz.).

1.6.2.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als ten minste éénmaal in een van de proeven een explosie (ontbranden en/of een knal staan hiermee gelijk) plaatsvindt met het beschreven slagapparaat of als het monster in een alternatieve slagproef gevoeliger is dan 1,3-dinitrobenzeen of RDX.

1.6.3. **Mechanische gevoeligheid (wrijving)**

1.6.3.1. *Apparatuur (figuur 5)*

Het wrijvingsapparaat bestaat uit een gietstalen grondplaat waarop het eigenlijke wrijvingstoestel gemonteerd is. Het wrijvingstoestel bestaat uit een vaste porseleinen pen en een bewegende porseleinen plaat. De porseleinen plaat zit vast in een slede welke tussen twee geleiders beweegt. De slede wordt via een aandrijfstang, een excentrische nok en een geschikt drijfwerk op zodanige wijze met een elektromotor verbonden, dat de porseleinen plaat slechts éénmaal onder de porseleinen pen heen en weer wordt bewogen over een afstand van 10 mm. De porseleinen pen kan belast worden met bij voorbeeld 120 of 360 newton.

De vlakke porseleinen platen worden van wit technisch porselein (oppervlakteruwheid tussen 9 en 32 µm) gemaakt en zijn 25 mm lang, 25 mm breed en 5 mm hoog. De cilindrische porseleinen pen wordt eveneens van wit technisch porselein gemaakt, is 15 mm lang, heeft een doorsnede van 10 mm en bolvormige uiteinden met een rondingsstraal van 10 mm, en geruwd oppervlak.

1.6.3.2. *Testomstandigheden*

Het monstervolume dient 10 mm³ te bedragen of overeen te komen met het vulvolume in een alternatief apparaat.

Vaste stoffen dienen in droge toestand te worden onderzocht en worden als volgt voorbereid :

a) poedervormige stoffen worden gezeefd (maaswijdte 0,5 mm); alles wat de zeef doorlaat, wordt voor de test gebruikt;

b) samengeperste, gegoten of op andere wijze verdichte stoffen worden in stukken gebroken en gezeefd; de zeeffractie kleiner dan 0,5 mm wordt gebruikt voor de test.

Stoffen die gewoonlijk als pasta's geleverd zouden worden, moeten, in de mate van het mogelijke, in droge staat worden getest. Wanneer de stoffen niet in droge staat kunnen worden bereid, wordt de pasta (na het zoveel mogelijk verwijderen van vloeistof) getest als een 0,5 mm dikke, 2 mm brede en 10 mm lange plak, bereid met behulp van een mal.

1.6.3.3. *Uitvoering van de proeven*

De porseleinen pen wordt op het te onderzoeken monster geplaatst en de belasting wordt aangebracht. Tijdens de test moeten de groeven van de porseleinen plaat loodrecht op de bewegingsrichting liggen. Er moet goed op worden gelet dat de pen op het monster rust, dat voldoende van de te onderzoeken stof onder de pen ligt en dat de plaat op de juiste wijze onder de pen doorbeweegt. Voor pasta's wordt een 0,5 mm dikke mal met een gleuf van 2 bij 10 mm gebruikt om de pasta op de plaat aan te brengen. De porseleinen plaat moet in 0,44 seconden onder de porseleinen pen heen en weer bewegen over een afstand van 10 mm. De pen en elk gedeelte van het oppervlak mogen slechts voor één test worden gebruikt; de twee uiteinden van de pen kunnen dus dienen voor twee proeven en de twee oppervlakken van de plaat elk voor drie proeven.

Een reeks van zes proeven wordt uitgevoerd met 360 N belasting. Als een positief resultaat wordt verkregen tijdens deze zes proeven, moet een tweede reeks van zes proeven worden uitgevoerd met 120 N belasting.

Bij gebruik van andere apparatuur wordt het monster vergeleken met de gekozen referentiestof via een vastgestelde procedure (bij voorbeeld op-en-neer-techniek, enz.)

1.6.3.4. *Beoordeling*

Het testresultaat wordt als positief beschouwd als ten minste in één van de proeven een explosie (knetteren en/of een knal of ontbranden staan hiermee gelijk) plaatsvindt met het beschreven wrijvingsapparaat of als aan gelijkwaardige eisen voldaan wordt in andere wrijvingsapparatuur.

2. GEGEVENS

In beginsel wordt in de zin van dit besluit aan een stof of preparaat explosiegevaar toegeschreven indien een positief resultaat wordt verkregen in de thermische-, schok- of wrijvingsgevoeligheidstest.

3. RAPPORTAGE

3.1. TESTRAPPORT

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- de identiteit, samenstelling, zuiverheid, vochtgehalte, enz. van de onderzochte stof;
- de fysische vorm van het monster, en of het al dan niet werd verpulverd, gebroken en/of gezeefd;
- waarnemingen tijdens de thermische-gevoeligheidstests (bij voorbeeld de monstermassa, aantal fragmenten, enz.);
- waarnemingen tijdens de mechanische-gevoeligheidstests (bij voorbeeld de vorming van grote hoeveelheden rook of complete ontleding zonder knal, vlammen, vonken, knallen, knetteren, enz.);
- de resultaten van elke soort test;
- indien afwijkende apparatuur is gebruikt, moet dit op wetenschappelijke gronden worden gerechtvaardigd; bovendien moet de correlatie tussen meetresultaten met de afwijkende apparatuur en de hierboven beschreven apparatuur bewezen worden;
- eventueel nuttige opmerkingen, zoals verwijzing naar proeven met soortgelijke produkten, die van belang kunnen zijn voor een correcte interpretatie van de resultaten;
- alle aanvullende opmerkingen die van belang kunnen zijn voor een goede interpretatie van de resultaten.

3.2. INTERPRETATIE EN BEOORDELING VAN DE RESULTATEN

In het testrapport moet worden vermeld welke resultaten als onjuist, afwijkend of niet-representatief worden beschouwd. Indien een van de resultaten moet worden verworpen, dient een toelichting en de resultaten van alle alternatieve of aanvullende proeven te worden gegeven. Indien een afwijkend resultaat niet kan worden verklaard, moet het worden aanvaard en gebruikt om de stof overeenkomstig in te delen.

4. LITERATUUR

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Tests and criteria, 1990, United Nations, New York
- (2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990
- (3) Koenen, H., Ide, K.H., en Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 en 30-42
- (4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use—Determination of explosive risk

Aanhangsel

Voorbeeld van materiaalspecificatie voor thermische-gevoeligheidstest (zie DIN 1623)

- (1) Buis : Materiaalspecificatie nr. 1.0336.505 g
- (2) Afsluitplaat : Materiaalspecificatie nr. 1.4873
- (3) Getapte kraag en moer : Materiaalspecificatie nr. 1.3817

Figuur 1

Apparatuur voor de thermische gevoeligheidstest

Alle afmetingen in mm

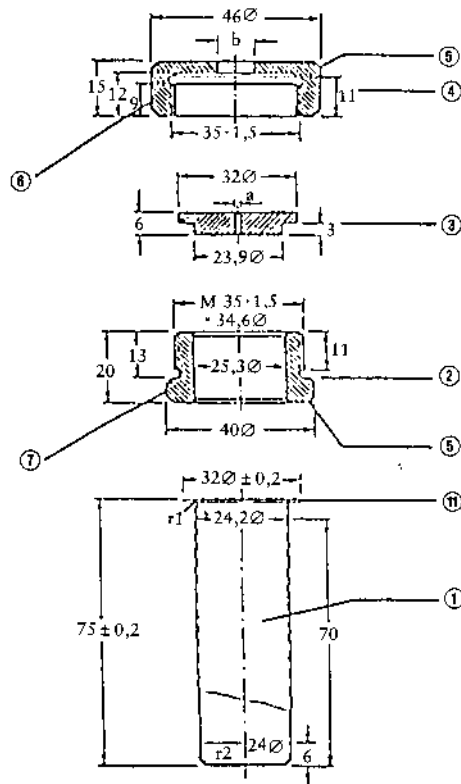


Fig. 1a Stalen buis en toebehoren

- (1) buis
- (1a) buitenflens
- (2) kraag met schroefdraad
lage-wrijvingsdraad
- (3) afsluitplaat
(a = 2,0 of 6,0 mm)
- (4) moer (b = 10 mm)
- (5) afgeschuind vlak
- (6) 2 vlakken voor sleutel maat 41

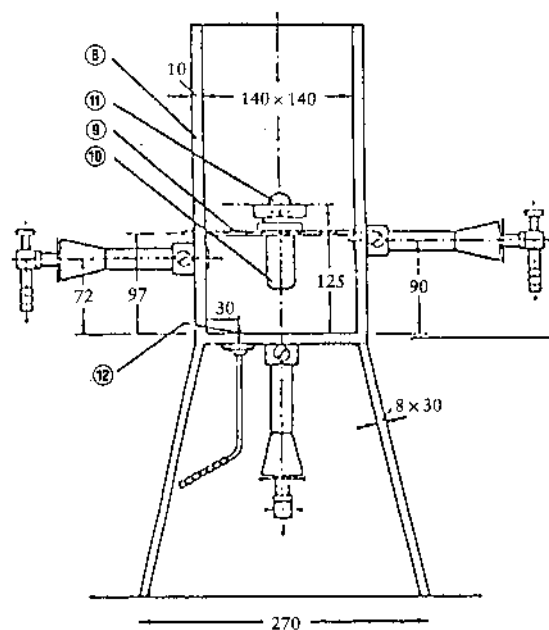
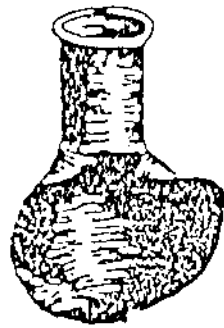


Fig. 1b Verwarmings- en beschermingstoestel

- (7) 2 vlakken voor sleutel maat 36
- (8) scherfvrije doos
- (9) 2 steunstaafjes voor buis
- (10) gemonteerde buis
- (11) positie van de achterste brander;
de andere branders zijn zichtbaar
- (12) spaarbrander

Figuur 2
Thermische-gevoeligheidstest
Voorbeelden van fragmentatie



Geen explosie



Geen explosie



Explosie



Explosie



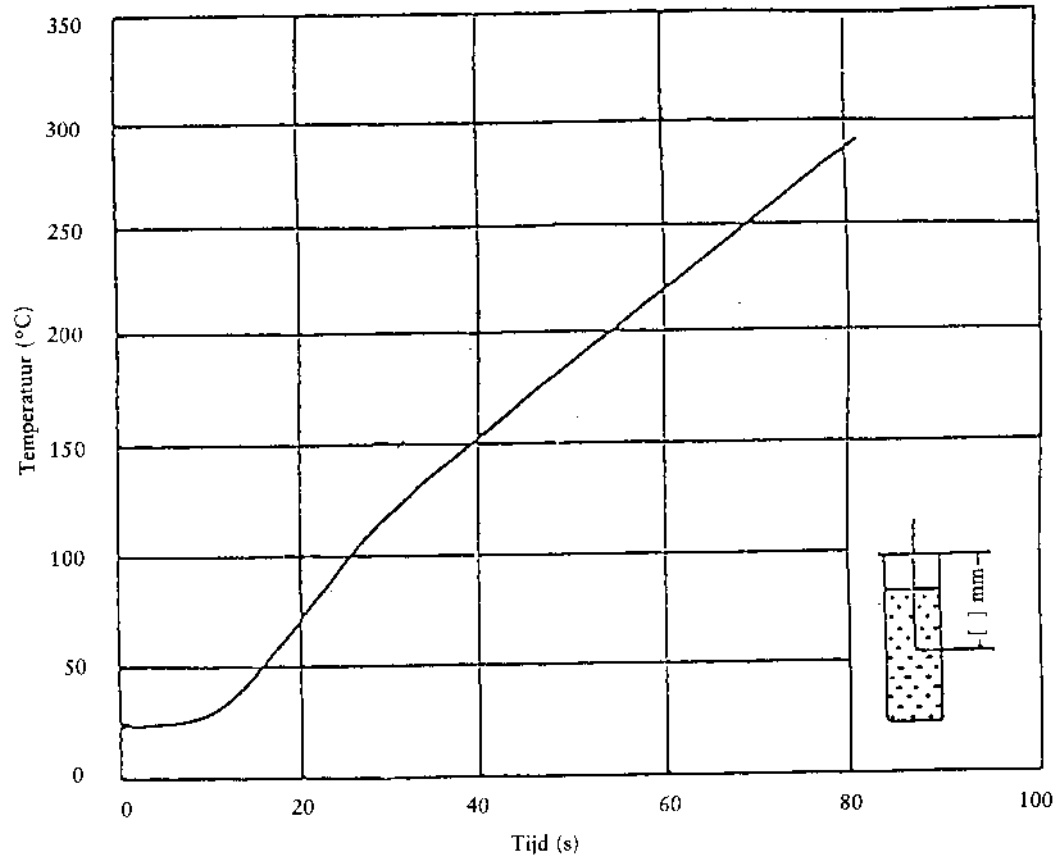
Explosie



Explosie

Figuur 3

Ijking voor opwarmingsnelheid in de thermische gevoeligheidstest



Temperatuur/tijd-curve verkregen door verhitting van dibutylftalaat (27 cm^3) in een gesloten (1,5 mm afsluitplaat) buis met behulp van een propaandebit van circa 3,2 liter/ minuut. De temperatuur wordt gemeten met een chromel/alumel thermokoppel, roestvrijstalen omhulsel van 1 mm doorsnede, in het midden van de buis geplaatst op 43 mm onder de rand. De opwarmingsnelheid in het bereik van $135 \text{ }^\circ\text{C}$ tot $285 \text{ }^\circ\text{C}$ moet tussen 185 en 215 K/minuut liggen.

Figuur 4
Schokgevoeligheidstest
(Afmetingen in mm)

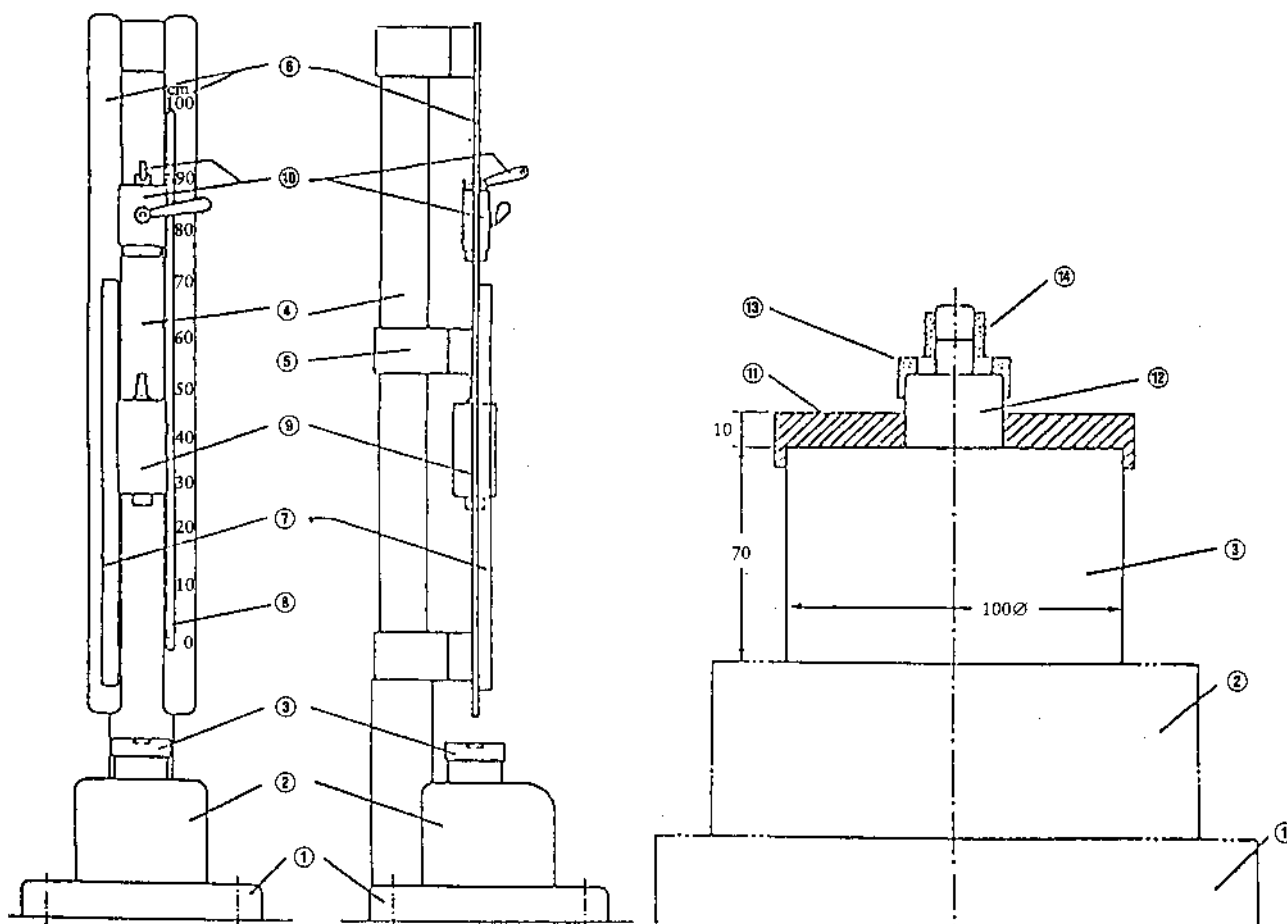


Fig. 4a Valhamer, vooren zij aanzicht, overzicht
(1) voetstuk, 450 × 450 × 60
(2) stalen blok, 230 × 250 × 200
(3) aambeeld, 100 doorsnede × 70
(4) kolom,
(5) middelste ophangsteun
(6) 2 geleiders
(7) getand rek
(8) meetschaal

Fig. 4b Valhamer, onderste deel
(9) valhamer
(10) ontkoppelinrichting
(11) centreerplaat
(12) tussen-aambeeld (verwisselbaar),
26 doorsnede × 26
(13) centreerring met openingen
(14) schoktoestel

Figuur 4

Vervolg

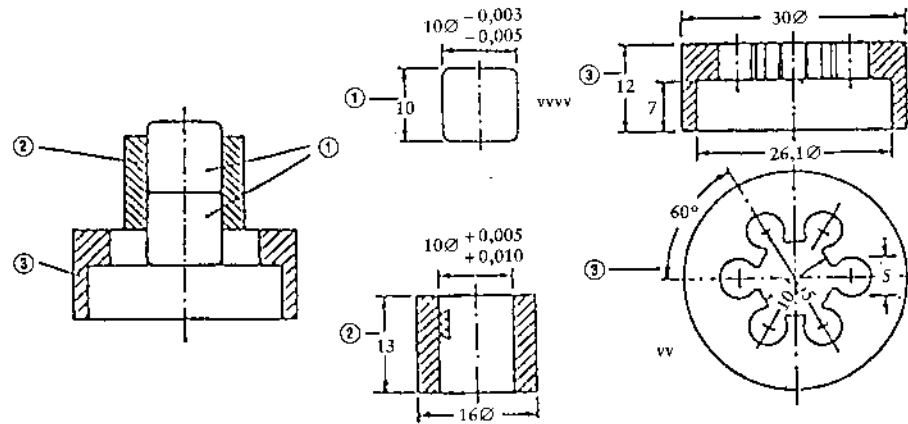


Fig. 4c Schoktoestel voor stoffen in poeder- of pasta-achtige vorm

- (1) stalen cilinders
- (2) geleidingsring voor stalen cilinders
- (3) centreerring met openingen
 - (a) verticale snede
 - (b) bovenaanzicht
- (4) rubber ring
- (5) vloeistof (40 mm³)
- (6) vloeistofloze ruimte

Fig. 4d Schoktoestel voor vloeistoffen

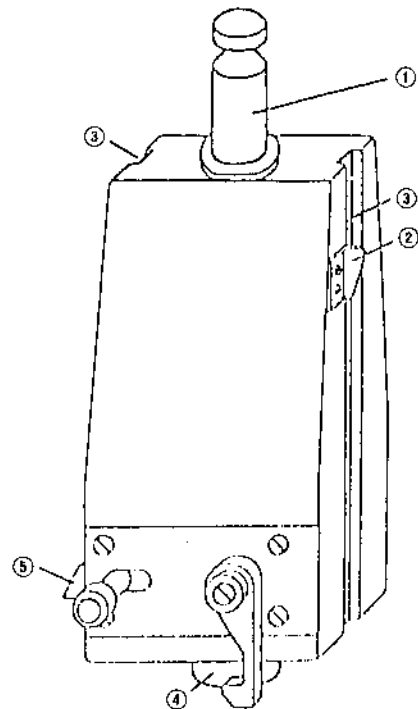
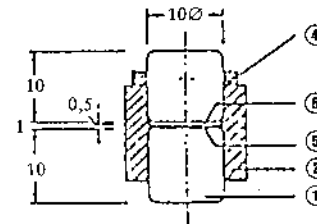


Fig. 4e Hamer (valgewicht van 5 kg)

- (1) insteekende
- (2) wijzertje voor de hoogte
- (3) positioneergroef
- (4) cilindrische slagkop
- (5) terugslaghaak

Figuur 5
Wrijvingsgevoeligheidstest

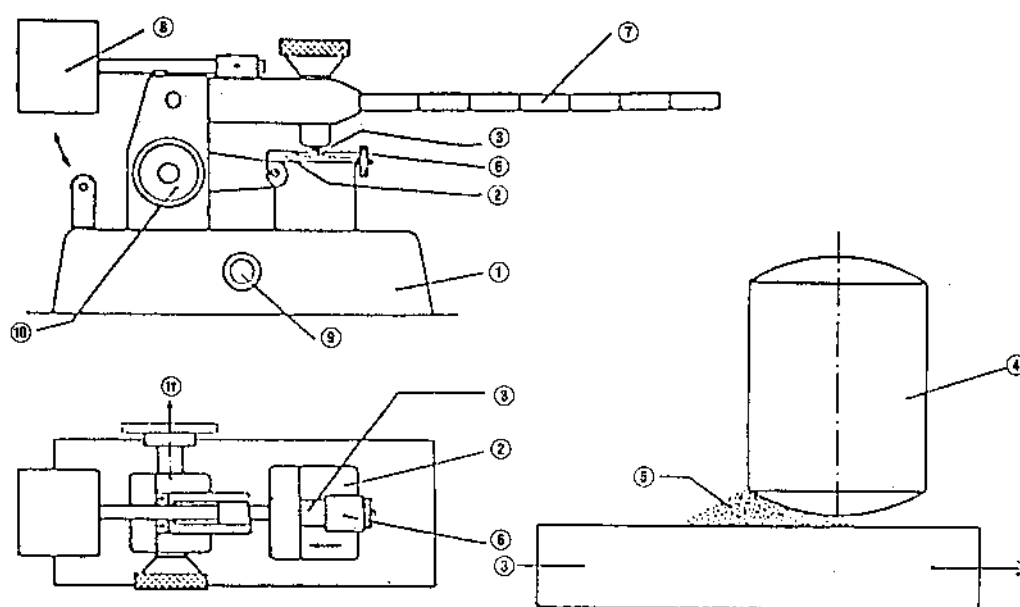


Fig. 5a Wrijvingstoestel;
verticaal- en bovenaanzicht

- (1) stalen voetstuk
- (2) beweegbare slede
- (3) porseleinen plaat, 25 × 25 × 5 mm,
vast op slede
- (4) vaste porseleinen pen,
10 doorsnede × 15 mm
- (5) monster tijdens de proef,
ongeveer 10 mm³
- (6) penhouder

Fig. 5b Beginpositie van de pen
op het monster

- (6) penhouder
- (7) belastingarm
- (8) tegengewicht
- (9) schakelaar
- (10) wiel om slede naar
startpositie te bewegen
- (11) overbrenging naar
elektromotor

A.15. ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR (VLOEISTOFFEN EN GASSEN)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Explosieve stoffen en stoffen die spontaan ontbranden in aanraking met lucht bij kamertemperatuur moeten niet onderworpen worden aan dit onderzoek. De testprocedure is van toepassing op gassen, vloeistoffen en dampen die in aanwezigheid van lucht door een heet oppervlak tot ontbranding kunnen worden gebracht.

De temperatuur waarbij zelfontbranding optreedt, kan aanzienlijk worden verlaagd door de aanwezigheid van katalytische verontreinigingen, door het oppervlakmateriaal, of door een groter volume van het proefvat.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De mate van zelfontbranding wordt uitgedrukt in de zelfontbrandingstemperatuur. De zelfontbrandingstemperatuur is de laagste temperatuur waarbij de te onderzoeken stof gemengd met lucht tot ontbranding komt onder omstandigheden zoals beschreven in deze testmethode.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

De referentiestoffen worden beschreven in de normen (zie 1.6.3). Deze stoffen zijn in de eerste plaats bedoeld om de werking van de methode regelmatig te controleren en om vergelijking met resultaten van andere methoden mogelijk te maken.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De methode bepaalt de laagste temperatuur van het binnenoppervlak van een vat, die leidt tot ontbranding van een in het vat geïnjecteerd(e) gas, damp, of vloeistof.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De reproduceerbaarheid is afhankelijk van het temperatuurgebied waarin de zelfontbranding optreedt, en van de gebruikte testmethode.

De gevoeligheid en specificiteit zijn afhankelijk van de gebruikte testmethode.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Apparatuur**

De apparatuur wordt beschreven in de onder 1.6.3 genoemde methode.

1.6.2. Testomstandigheden

De te onderzoeken stof wordt onderzocht volgens de methode beschreven onder 1.6.3.

1.6.3. Uitvoering van de test

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

2. GEGEVENS

Registreer de testtemperatuur, de atmosferische druk, de gebruikte hoeveelheid stof en de tijdsduur tot ontbranding.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- nauwkeurige specificatie van de te onderzoeken stof (beschrijving en verontreinigingen);
- de gebruikte hoeveelheid stof en de atmosferische druk;
- de gebruikte apparatuur;
- de resultaten van metingen (testtemperaturen, resultaten met betrekking tot ontbranding en bijbehorende tijdsduur);
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

4. LITERATUUR

Geen.

A.16. RELATIEVE ZELFONTBRANDINGSTEMPERATUUR VAN VASTE STOFFEN**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Explosiegevaarlijke stoffen en stoffen die in contact met lucht bij kamertemperatuur spontaan ontbranden, moeten niet aan deze test worden onderworpen.

Deze test geeft oriënterende informatie over de zelfontbrandbaarheid van vaste stoffen bij verhoogde temperatuur.

Indien de warmte, die vrijkomt bij reactie van de stof met zuurstof of bij exotherme ontleding, niet snel genoeg aan de omgeving wordt afgegeven, vindt zelfopwarming en uiteindelijk zelfontbranding plaats. Zelfontbranding kan dus slechts optreden als de snelheid van de warmteproductie groter is dan die van het warmteverlies.

De testprocedure is bruikbaar als een oriënterende proef voor vaste stoffen. Omdat de ontsteking en verbranding van vaste stoffen ingewikkelde processen zijn, mag de volgens deze testmethode bepaalde zelfontbrandingstemperatuur alleen voor vergelijkingsdoeleinden worden gebruikt.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

De zelfontbrandingstemperatuur, die met deze methode verkregen wordt, is de laagste omgevingstemperatuur in °C waarbij een bepaald volume van een stof onder welbepaalde omstandigheden ontbrandt.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Niet gegeven.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een bepaald volume van de te onderzoeken stof wordt bij kamertemperatuur in een oven geplaatst; het temperatuurverloop in het midden van het monster wordt als functie van de tijd geregistreerd, terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 °C/minuut wordt opgevoerd tot 400 °C of tot de smelttemperatuur indien deze lager is. Voor het doel van deze test wordt de temperatuur van de oven, waarbij de temperatuur van het monster door zelfopwarming 400 °C bereikt, de zelfontbrandingstemperatuur genoemd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Niet gegeven.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Apparatuur

1.6.1.1. Oven

Een laboratoriumoven van ongeveer 2 liter, waarvan het temperatuurverloop lineair geregeld kan worden, en voorzien van natuurlijke luchtcirculatie en explosieontlasting. Ten einde eventueel explosiegevaar te vermijden, moet voorkomen worden dat ontledingassen in contact kunnen komen met de elektrische verwarmingselementen.

1.6.1.2. Gazen kubus

Een stuk roestvrij staalgaas met openingen van 0,045 mm moet worden uitgeknipt volgens het patroon van figuur 1. Het gaas wordt gevouwen en met draad vastgemaakt in de vorm van een kubus met open bovenkant.

1.6.1.3. Thermokoppels

Geschikte thermokoppels.

1.6.1.4. Recorder

Tweekanaalsrecorder, gecalibreerd van 0 tot 600 °G of hiermee overeenkomstige spanning.

1.6.2. Testomstandigheden

De stoffen worden getest zoals ontvangen.

1.6.3. Uitvoering van de test

De kubus wordt gevuld met de te onderzoeken stof waarbij onder zachtjes tikken zoveel stof toegevoegd wordt dat de kubus volledig gevuld is. Vervolgens wordt de kubus bij kamertemperatuur midden in de oven gehangen. Het ene thermokoppel wordt in het middelpunt van de kubus gebracht en het tweede tussen de kubus en de ovenwand om de oventemperatuur te registreren.

De temperaturen van de oven en van het monster worden continu geregistreerd terwijl de temperatuur van de oven met een snelheid van 0,5 °C/min wordt opgevoerd tot 400 °C of tot de smelttemperatuur indien deze lager is dan 400 °C.

Wanneer de stof reageert, zal het thermokoppel in het monster een scherpe temperatuurstijging boven de oventemperatuur te zien geven.

2. GEGEVENS

De oventemperatuur, waarbij de temperatuur van het monster door zelfopwarming 400 °C bereikt, is van belang voor de beoordeling (zie figuur 2).

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

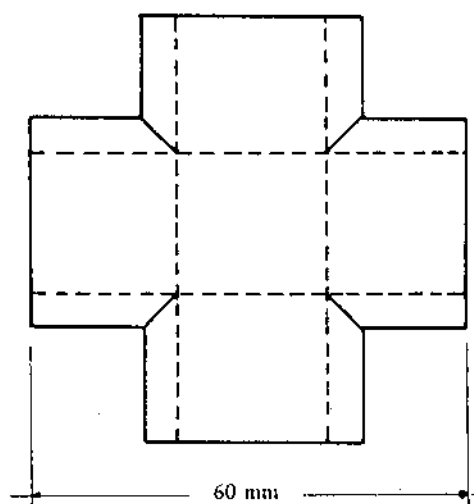
- een beschrijving van de onderzochte stof;
- de meetresultaten inclusief de temperatuur/tijd-grafiek;
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor interpretatie van de resultaten.

4. LITERATUUR

(1) NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

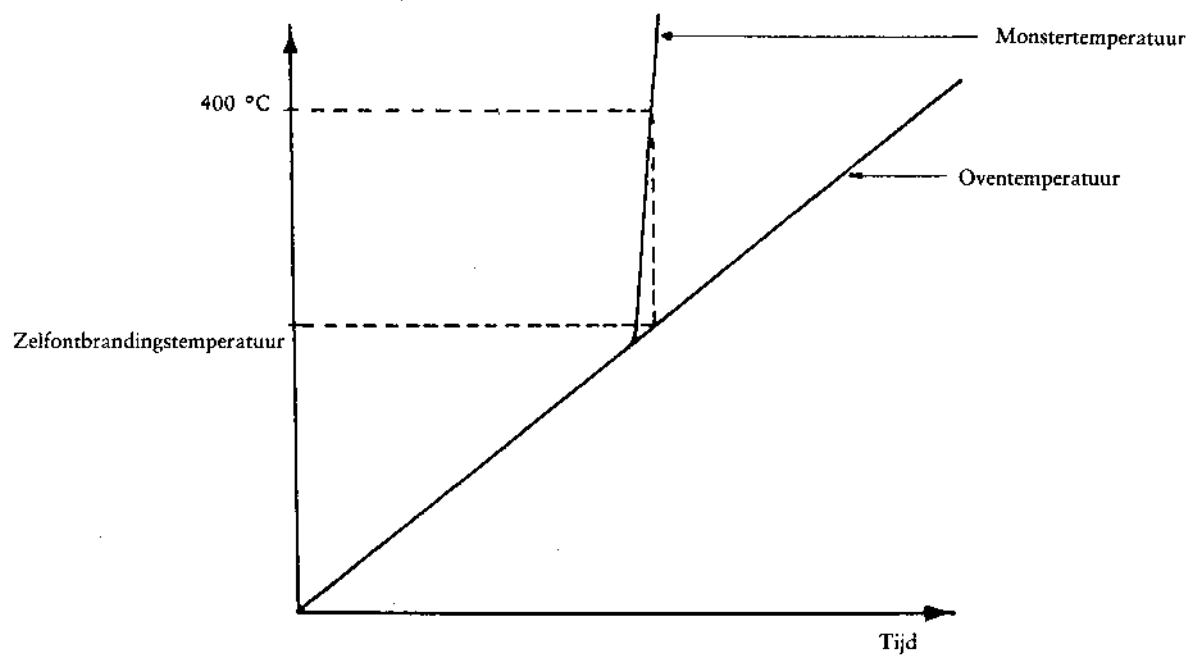
Figuur 1

Patroon van de testkubus met ribben van 20 mm



Figuur 2

Karakteristieke temperatuur/tijd-kurve



A.17. OXIDERENDE EIGENSCHAPPEN (VASTE STOFFEN)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Het is nuttig om, voordat deze test wordt uitgevoerd, te beschikken over gegevens over de mogelijke explosieve eigenschappen van de te onderzoeken stof.

Deze test is niet toepasbaar op vloeistoffen en gassen, explosieve of licht ontvlambare vaste stoffen of organische peroxiden.

Deze test hoeft niet uitgevoerd te worden als op grond van de structuurformule met afdoende zekerheid kan worden vastgesteld dat de stof niet exotherm kan reageren met een brandbare stof.

Ten einde vast te stellen of voor deze test speciale voorzorgsmaatregelen nodig zijn, moet een oriënterende proef worden uitgevoerd.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Brandduur : de tijd in seconden die de reactiezone nodig heeft om zich langs een rups stof te verplaatsen, volgens de werkwijze van 1.6.

Brandsnelheid : de bijbehorende snelheid in mm/s.

Maximale brandsnelheid : de hoogste waarde van de brandsnelheden van mengsels die 10 tot 90 gewichtsprocent oxiderende stof bevatten.

1.3. REFERENTIESTOF

Als referentiestof voor de test en de oriënterende proef wordt bariumnitraat (analytisch zuiver) gebruikt.

Het referentiemengsel is het volgens 1.6 bereide mengsel van bariumnitraat en poedervormige cellulose, dat de grootst mogelijke brandsnelheid heeft (doorgaans een mengsel met 60 gewichtsprocent bariumnitraat).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Met het oog op de veiligheid wordt een oriënterende proef uitgevoerd. Verdere onderzoeken zijn onnodig wanneer uit de oriënterende proef overduidelijk blijkt dat de te onderzoeken stof oxiderende eigenschappen heeft. In andere gevallen wordt de stof aan het volledige onderzoek onderworpen.

In het volledige onderzoek wordt de te onderzoeken stof in verschillende verhoudingen gemengd met een bepaalde brandbare stof. Van ieder mengsel wordt een rups gevormd en deze wordt aan één uiteinde aangestoken. De maximale brandsnelheid wordt bepaald en vergeleken met de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Indien nodig kunnen de stoffen op willekeurige wijze worden gemalen en gemengd, mits de maximale brandsnelheden uit de zes verschillende bepalingen niet meer dan 10 % verschillen van hun rekenkundige gemiddelde.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE METHODE**1.6.1. Voorbereiding****1.6.1.1. Teststof**

De deeltjesgrootte van het te onderzoeken monster wordt als volgt tot minder dan 0,125 mm verkleind : de stof wordt gezeefd en de overblijvende fractie gemalen; deze handelingen worden herhaald totdat de gehele portie door de zeef is gegaan.

Iedere methode voor malen en zeven kan worden gebruikt, zolang aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de stof eerst tot constant gewicht gedroogd bij 105 °C. Indien de ontledingstemperatuur van de te onderzoeken stof beneden 105 °C ligt, wordt de stof bij een lagere temperatuur gedroogd.

1.6.1.2. Brandbare stof

Poedervormige cellulose wordt gebruikt als brandbare stof. De cellulose moet het soort zijn dat wordt gebruikt bij dunne-laagchromatografie of kolomchromatografie. Een type waarbij meer dan 85 % van de vezels een lengte hebben tussen 0,020 en 0,075 mm is geschikt gebleken. Het cellulosepoeder wordt gezeefd door een zeef met openingen van 0,125 mm. Eén en dezelfde voorbereikte batch cellulose wordt gebruikt gedurende de hele proef.

Vóór het bereiden van het mengsel wordt de poedervormige cellulose bij 105 °C tot constant gewicht gedroogd.

Indien in de oriënterende proef houtmeel wordt gebruikt, wordt het houtmeel van naaldhout gebruikt dat door een zeef met openingen van 1,6 mm valt; het gezeefde houtmeel wordt grondig gemengd en vervolgens vier uur bij 105 °C gedroogd in een laag van maximaal 25 mm dikte. Na afkoelen wordt het houtmeel in een luchtdicht vat dat zover mogelijk gevuld is, bewaard tot het ogenblik waarop het wordt gebruikt, zo mogelijk binnen 24 uur na het drogen.

1.6.1.3. Ontstekingsbron

Als ontstekingsbron dient de hete vlam van een gasbrander (minimale diameter 5 mm). Indien een andere ontstekingsbron wordt gebruikt (bij voorbeeld bij proeven in een inerte atmosfeer), moeten beschrijving, redenen en geschiktheid worden gerapporteerd.

1.6.2. Uitvoering van de test**Opmerking :**

In verband met mogelijk explosiegevaar moeten mengsels van oxiderende stoffen en cellulose of houtmeel met de nodige voorzichtigheid worden behandeld.

1.6.2.1. Oriënterende proef

Twee gewichtsdelens gedroogde stof worden grondig gemengd met één gewichtsdeel cellulose of houtmeel. Van het mengsel wordt, bij voorbeeld met behulp van een glazen trechter waarvan de steel is dichtgestopt, zonder aandrukken een kegelvormig hoopje gemaakt met een basisdiameter van 3,5 cm en een hoogte van 2,5 cm.

Het hoopje wordt op een koude, onbrandbare, niet poreuze en slecht warmtegeleidende grondplaat geplaatst. De oriënterende proef moet worden uitgevoerd in een zuurkast zoals beschreven in 1.6.2.2.

De ontstekingsbron wordt in contact gebracht met het hoopje stof. De heftigheid en de duur van de reactie worden geobserveerd en geregistreerd.

De stof kan worden aangemerkt als oxiderend als de reactie heftig verloopt.

Zodra het resultaat aanleiding geeft tot enige twijfel, dient de hieronder beschreven volledige test te worden uitgevoerd.

1.6.2.2. Volledig onderzoek

Er worden mengsels van de oxiderende stof en de brandbare stof gemaakt, waarbij het gehalte oxiderende stof in stappen van 10 gewichtsprocenten oploopt van 10 tot 90 gewichtsprocenten. In grensgevallen moeten tussenliggende mengverhoudingen worden bereid, zodat de maximale brandsnelheid nauwkeuriger kan worden bepaald.

Er wordt een rupsstof gevormd met behulp van een mal. Deze mal is van metaal, heeft een lengte van 250 mm en een driehoekige doorsnede met een hoogte van 10 mm en een basis van 20 mm. Aan weerszijden van de mal worden in de lengterichting twee metalen platen aangebracht die 2 mm boven de driehoekige doorsnede uitsteken (zie figuur). De mal wordt zonder aandrukken gevuld met een kleine overmaat van het mengsel. Na de mal eenmaal van een hoogte van 2 cm op een vast oppervlak te hebben laten vallen, wordt de overmaat mengsel met een schuingehouden blad weggeveegd. De zijstroken worden verwijderd en het overblijvende poeder wordt met een rol glad gestreken. Ten slotte wordt bovenop de mal een vuurvaste, niet poreuze en slecht warmtegeleidende plaat gelegd, het geheel wordt omgekeerd en de mal verwijderd.

De rups wordt in de zuurkast geplaatst in een richting loodrecht op de richting van de trek.

De luchtsnelheid moet voldoende zijn om te verhinderen dat verbrandingsgassen naar de laboratoriumruimte ontsnappen; de luchtsnelheid mag gedurende de test niet veranderd worden. De apparatuur moet worden omgeven door een tochtscherm.

In verband met de hygroscopische eigenschappen van cellulose en sommige te onderzoeken stoffen moet de test zo snel mogelijk worden uitgevoerd.

Eén uiteinde van de rups wordt aangestoken door aanraking met de vlam.

De brandduur wordt gemeten over een lengte van 200 mm, nadat de reactiezone reeds een beginafstand van 30 mm heeft afgelegd.

De test wordt uitgevoerd met de referentiestof en vervolgens ten minste éénmaal met elk mengsel uit de reeks van de te onderzoeken stof en cellulose.

Indien een maximale brandsnelheid wordt waargenomen die aanzienlijk hoger is dan de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel, kan de test worden gestaakt; zo niet, dan moet de test vijfmaal worden herhaald met de drie mengsels die de hoogste brandsnelheid opleverden.

Indien men vermoedt dat het resultaat vals positief is, moet de test herhaald worden met een inerte stof met een zelfde deeltjesgrootte, zoals kiezelgoer, in plaats van cellulose. Ook kan het mengsel te onderzoeken stof/cellulose, dat de grootste verbrandingssnelheid heeft, opnieuw getest worden in een inerte atmosfeer (< 2 % v/v zuurstofgehalte).

2. GEGEVENS

Om veiligheidsredenen moet de hoogste brandsnelheid — en niet de gemiddelde waarde — worden beschouwd als kenmerk voor de oxiderende eigenschappen van de stof.

De hoogste waarde van de brandsnelheid binnen een serie van zes metingen voor één bepaald mengsel geldt voor de beoordeling.

Maak een grafiek waarin de hoogste waarde van de brandsnelheid van ieder mengsel wordt uitgezet tegen de concentratie van de oxiderende stof in ieder mengsel; bepaal uit deze grafiek de maximale brandsnelheid.

De zes waarden van de brandsnelheid, in een serie van zes metingen op het mengsel met de hoogste brandsnelheid, mogen niet meer dan 10 % afwijken van hun rekenkundig gemiddelde; anders moeten de gebruikte methoden voor malen en mengen verbeterd worden.

Vergelijk de verkregen maximale brandsnelheid met de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel (zie 1.3).

Als tests worden uitgevoerd in een inerte atmosfeer, moet de maximale reactiesnelheid worden vergeleken met die van het referentiemengsel in een inerte atmosfeer.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- beschrijving, samenstelling, zuiverheid, vochtgehalte, enz. van de onderzochte stof;
- eventuele voorbehandeling van de onderzochte stof (bij voorbeeld malen, drogen, enz.)
- de in de onderzoeken gebruikte ontstekingsbron;
- de resultaten van de metingen;
- de wijze van reactie (bij voorbeeld een "flash verbranding" aan het oppervlak of een verbranding door de gehele massa, eventuele informatie met betrekking tot de verbrandingsprodukten, enz.);
- alle verdere opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten, inclusief een beschrijving van de heftigheid (vlammen, vonken, rook, smeulen, en dergelijke) en een schatting van de brandduur van de oriënterende proef, zowel voor de teststof als voor de referentiestof;
- de resultaten van proeven met een inerte stof, indien van toepassing;
- de resultaten van proeven in een inerte atmosfeer, indien van toepassing.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Een stof wordt aangemerkt als een oxiderende stof wanneer :

- (a) er in de oriënterende proef een heftige reactie optreedt;
- (b) in de volledige test de maximale brandsnelheid van de onderzochte mengsels groter is dan of gelijk is aan de maximale brandsnelheid van het referentiemengsel van cellulose en bariumnitraat.

Om vals positieve resultaten te vermijden, dient bij het verwerken van de resultaten ook rekening gehouden te worden met de resultaten verkregen bij het testen van stof gemengd met inert materiaal en/of in een inerte atmosfeer.

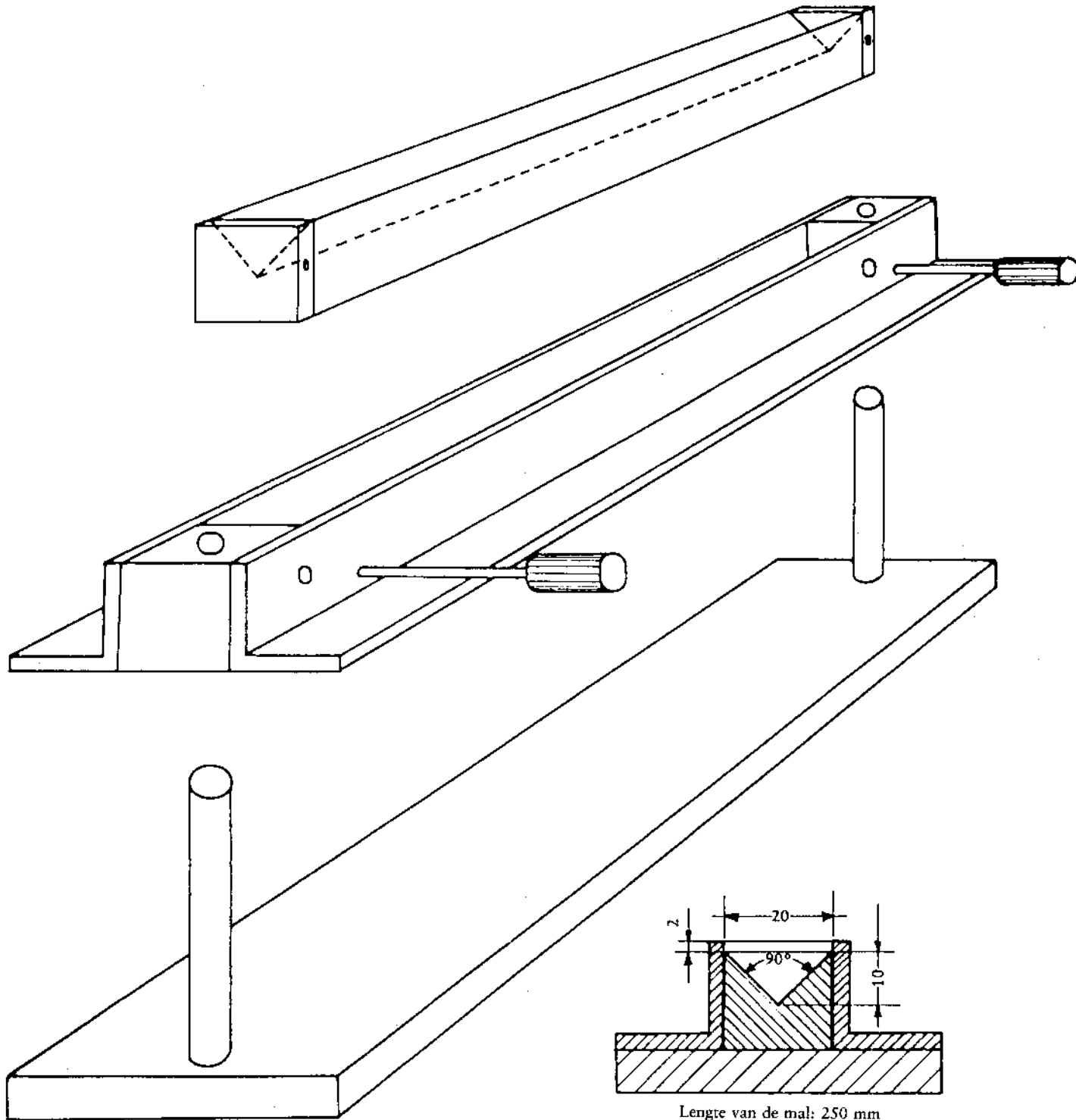
4. LITERATUUR

- (1) NF T 20-035 (Sept. 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Aanhangsel

Figuur

Mal en toebehoren voor de bereiding van de rups
(Afmetingen in mm)



Lengte van de mal: 250 mm
Materiaal: aluminium

DEEL B : METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE TOXICITEIT

ALGEMENE INLEIDING DEEL B

A. INLEIDING

Zie algemene inleiding.

B. DEFINITIES

(i) **Acute toxiciteit** omvat de schadelijke effecten die binnen een gegeven tijd (meestal 14 dagen) na de toediening van een enkelvoudige dosis van een stof optreden.

(ii) **LD₅₀** (mediaan letale dosis) is de statistisch vastgestelde enkelvoudige dosis van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de dieren die de dosis hebben ontvangen de dood intreedt. De LD₅₀-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per gewichtseenheid proefdier (mg/kg).

(iii) **LC₅₀** (mediaan letale concentratie) is de statistisch vastgestelde concentratie van een stof, waarvan kan worden verwacht dat bij 50 % van de gedurende een bepaalde tijd blootgestelde dieren, tijdens de blootstelling of binnen een bepaalde tijd na de blootstelling, de dood intreedt. De LC₅₀-waarde wordt uitgedrukt in het gewicht van de teststof per standaardvolume lucht (mg/l).

(iv) **Het niveau zonder schadelijk effect** is de hoogste dosis of het hoogste niveau van blootstelling tijdens een proef, waarbij nog geen waarneembare toxiciteitsverschijnselen optreden.

(v) **Subacute/subchronische toxiciteit** omvat de schadelijke effecten die bij proefdieren optreden als gevolg van de dagelijks herhaalde toediening van of blootstelling aan een chemische stof gedurende een klein gedeelte van hun verwachte levensduur.

(vi) **De maximaal verdraagbare dosis** (MTD) is het hoogste dosisniveau dat tekenen van toxiciteit bij proefdieren tot gevolg heeft zonder dat dit belangrijke gevolgen heeft voor de overleving in de test waarin ze wordt gebruikt.

(vii) **Huidirritatie** is het ontstaan van een reversibele ontstekingsreactie in de huid als gevolg van het toedienen van een teststof op de huid.

(viii) **Oogirritatie** is het ontstaan van reversibele veranderingen in het oog als gevolg van de toediening van een teststof op het oppervlak aan de voorzijde van het oog.

(ix) **Sensibilisering** van de huid (allergische contactdermatitis) is een via het immuunsysteem veroorzaakte reactie van de huid op een stof.

Specifieke definities voor inhalatietoxiciteit

— **een aerosol** wordt gedefinieerd als deeltjes (vast en/of vloeibaar) homogeen verdeeld in lucht.

— **de aërodynamische diameter** is de doorsnede van een bol met dichtheid van 1 g/cm³ met dezelfde eind-val-snelheid als het bewuste deeltje.

— **de massa-mediaan van de aërodynamische diameter** (MMAD) is de berekende aërodynamische diameter die de grootteverdeling van het aerosol, gemeten naar de massa, in tweeën verdeelt.

— **de geometrische standaarddeviatie (GSD)** is de verhouding van het geschatte 84 percentiel tot het 50 percentiel, en duidt de helling aan van de verdelingscurve van de cumulatieve deeltjesgrootte, aangenomen dat de grootteverdeling log-normaal is.

Specifieke definities voor de vastgestelde dosisprocedure bij de bepaling van acute orale toxiciteit

— onder **evidente intoxicatie** worden verstaan de intoxicatieverschijnselen die worden waargenomen na toediening van een teststof en die zo ernstig zijn dat de toediening van het naast hogere dosisniveau sterfte zou kunnen veroorzaken.

— onder **discriminerende dosis** wordt verstaan het hoogste van de vier vastgestelde dosisniveaus die kunnen worden toegediend zonder dat met de teststof verband houdende sterfte wordt veroorzaakt (met inbegrip van dieren die moesten worden afgemaakt).

C. MUTAGENITEIT (inclusief pre-screeningtest voor carcinogeniteit)

Voor de voorlopige bepaling van de mutagene werking van een stof is het noodzakelijk gegevens te verkrijgen over twee categorieën van eindpunten, namelijk genmutaties en chromosoomafwijkingen.

Deze twee eindpunten worden geëvalueerd aan de hand van de volgende proeven :

(i) tests voor genmutaties in prokaryotische cellen zoals *Salmonella typhimurium*; tests die gebruik maken van *Escherichia coli* zijn ook aanvaardbaar. Welke van deze twee testorganismen gekozen wordt, kan afhangen van de aard van de chemische stof die getest wordt;

(ii) tests voor chromosoomafwijkingen in de in vitro gekweekte cellen van zoogdieren; een in vivo test (de micronucleustest of het metafaseonderzoek van beenmergcellen) is eveneens aanvaardbaar. De in vitro methoden zijn echter sterk te verkiezen in de afwezigheid van contra-indicaties.

D. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Bij de evaluatie en interpretatie van de testresultaten moet rekening worden gehouden met de beperkingen ten aanzien van de mate waarin de resultaten van dierproeven en in vitro tests kunnen worden geëxtrapoleerd naar de mens.

Voor zover beschikbaar kan het bewijs van ongunstige effecten op de mens van belang zijn voor de bepaling van de potentiële effecten van chemische stoffen op de menselijke bevolking.

E. LITERATUUR

Toxicologie is een zich snel ontwikkelende experimentele wetenschap waarover overvloedig literatuurgegevens ter beschikking zijn. Relevante informatie kan worden gevonden in de "Test Guidelines" van de OESO.

Nadere opmerkingen

Verzorging van de dieren

Bij toxiciteitstests zijn een stringente bewaking van de leefomstandigheden en een goede verzorging van de dieren een eerste vereiste.

(i) Huisvestingsomstandigheden

De leefomstandigheden in de kamers of ruimten waar de proefdieren zijn ondergebracht, moeten geschikt zijn voor het soort proefdier. Voor ratten, muizen en cavia's is een kamertemperatuur van 22 °C (± 3 °C) en een relatieve vochtigheidsgraad van 30-70 % passend; voor konijnen moet de temperatuur 20 °C (± 3 °C) en de relatieve vochtigheidsgraad 30-70 % bedragen.

Sommige experimentele technieken zijn bijzonder gevoelig voor temperatuureffecten; in dergelijke gevallen wordt in de beschrijving van de onderzoeksmethode uitvoerig ingegaan op de in dat geval juiste omstandigheden. Bij ieder onderzoek naar toxische effecten moeten de temperatuur en de vochtigheidsgraad worden gecontroleerd, opgetekend en in het eindverslag over de studie worden opgenomen.

Bij gebruik van kunstlicht moet in normale gevallen een schema van twaalf uur licht—twaalf uur duisternis worden aangehouden. Nadere gegevens over de verlichting moeten worden opgetekend en in het eindverslag worden opgenomen.

Het is belangrijk om in verslagen over dierproeven steeds aan te geven welk soort kooien is gebruikt en hoeveel dieren tijdens de blootstelling aan de chemische stof en tijdens latere waarnemingsperioden in iedere kooi waren gehuisvest.

(ii) Voeding

Bij de samenstelling van het voedsel moet rekening worden gehouden met alle eisen die de aan de proef onderworpen diersoorten aan hun voeding stellen. Indien chemische stoffen worden toegediend aan de dieren via de voeding, kan de voedingswaarde door interactie tussen de stof en een bestanddeel van de voeding verminderd worden.

Bij het interpreteren van de resultaten dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid van dergelijke reacties.

Onzuiverheden in de voeding waarvan bekend is dat ze de toxiciteit beïnvloeden, mogen niet in interfererende concentraties voorkomen.

Welzijn van de dieren

Bij het uitwerken van de testmethoden werd extra aandacht besteed aan dierenwelzijn. Enkele voorbeelden worden hieronder kort samengevat, maar deze lijst is niet volledig. De exacte bewoording en/of voorwaarden dienen nagelezen te worden in de tekst van de methoden :

— voor de bepaling van de acute orale toxiciteit wordt een alternatieve methode, de "vastgestelde dosismethode" ingevoerd. Bij deze test wordt niet uitgegaan van de dood als specifiek eindpunt. Bij deze methode worden minder dieren gebruikt en zij veroorzaakt minder ongerief en pijn dan de klassieke bepaling van de acute orale toxiciteit;

— het aantal dieren is teruggebracht tot het wetenschappelijk aanvaardbaar minimum : slechts vijf dieren van hetzelfde geslacht worden per dosisniveau getest voor de methoden B.1 en B.3; slechts tien dieren (en maar vijf voor de negatieve referentiegroep) worden gebruikt voor de bepaling van de sensibilisering van de huid door de Guinea Maximisation Test (methode B.6); het aantal dieren dat benodigd is voor de positieve controle bij het testen van de mutageniteit in vivo wordt ook verminderd (methoden B. 11 en B. 12);

— ongerief en pijn van de dieren worden tot een minimum teruggebracht; het kan nodig zijn dieren die ernstige, blijvende verschijnselen van ongerief en pijn vertonen, af te maken; het doseren van teststoffen volgens een methode waarvan bekend is dat zij corrosieve of irriterende eigenschappen bezitten, behoeft niet te worden uitgevoerd (methoden B.1, B.2 en B.3);

— het testen met irrelevant hoge doses wordt vermeden door de invoering van limietproeven, niet alleen bij de tests op acute toxiciteit (methoden B.1, B.2 en B.3) maar ook bij de in vivo tests op mutageniteit (methoden B.11 en B.12);

— een strategie voor tests op irritatie maakt het thans mogelijk een test niet uit te voeren of de studie te beperken tot een enkel dier wanneer voldoende wetenschappelijk bewijs kan worden geleverd.

Deze wetenschappelijke gegevens kunnen gebaseerd worden op de fysisch-chemische eigenschappen van de stof, de resultaten van andere reeds uitgevoerde proeven of de resultaten van goed gevalideerde in vitro proeven. Indien bij voorbeeld bij het uitvoeren van een onderzoek naar acute toxiciteit bij toediening op de huid geen huidirritatie werd waargenomen bij de limiettestdosis van de te onderzoeken stof (methode B.3), kan verder testen voor huidirritatie (methode B.4) overbodig zijn; stoffen die duidelijk bijtende of ernstige huidirriterende eigenschappen vertonen bij het onderzoek naar huidirritatie (methode B.4), dienen niet verder te worden getest op oogirritatie (methode B.5).

B.1. ACUTE ORALE TOXICITEIT

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt oraal via een maagsonde in geleidelijk stijgende doseringen aan verscheidene groepen proefdieren toegediend. Er wordt één dosis per groep gebruikt. De gekozen doses kunnen gebaseerd worden op de resultaten van een voorexperiment. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij de dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij de dieren die aan het eind van het onderzoek nog leven, wordt necropsie verricht. Deze methode is in de eerste plaats gericht op studies met knaagdieren.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van ongemak of nood en pijn vertonen, zouden op humane wijze moeten worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van bijtende of irriterende eigenschappen pijn en ongemak veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde, jong volwassen dieren worden vóór de behandeling in ad random groepen ingedeeld. Zo nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om eerst gebruik te maken van een oplossing in water. Als dit niet mogelijk is, kan oplossen of suspenderen in achtereenvolgens plantaardige olie of een ander medium worden overwogen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn; als dit niet het geval is, moeten deze eigenschappen voor of gedurende het onderzoek worden bepaald. Bij knaagdieren mag het maximale volume dat voor de proef gebruikt wordt normaliter niet groter zijn dan 10 ml/kg lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water waarvan het volume maximaal 20 ml/kg mag bedragen. De variabiliteit in het voor de proef gebruikte volume moet zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten.

De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 5 knaagdieren worden gebruikt. Zij dienen van hetzelfde geslacht te zijn. Indien wijfjes worden gebruikt, moeten deze nullipaar zijn en niet zwanger. Indien informatie beschikbaar is die aantoonst dat één van beide geslachten duidelijk gevoeliger is, dienen dieren van dit geslacht gebruikt te worden.

Opmerking: In onderzoeken naar acute toxiciteit met dieren van een hogere orde dan ratten, dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen.

De doses dienen zorgvuldig te worden uitgekozen, en alle moeite dient te worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke tests dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

1.6.2.3. Dosisniveaus

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, waar mogelijk, op aanvaardbare wijze een LD₅₀ te bepalen.

1.6.2.4. Limiettest

Wanneer knaagdieren worden gebruikt, kan een limiettest worden uitgevoerd met één dosis van ten minste 2000 mg/kg lichaamsgewicht in een groep van 5 mannetjes en 5 wijfjes, met behulp van de hierboven beschreven testmethode. Indien sterfte wordt vastgesteld die met de teststof verband houdt, moet het uitvoeren van een volledige studie overwogen worden.

1.6.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen, het tijdstip waarop zij weer verdwijnen en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer er aanwijzingen zijn voor vertraagde sterfte.

1.6.3. Uitvoering

Vóór de toediening van de teststof moet de dieren voedsel worden onthouden. Aan ratten wordt in de nacht vóór de dosering geen voedsel verstrekt; voor dieren met een snellere stofwisseling kan die periode worden verkort; de consumptie van water is niet aan beperkingen onderworpen. De volgende dag moeten de dieren gewogen worden en vervolgens wordt de teststof in één enkele dosis via een maagsonde toegediend. Als het niet mogelijk is de teststof in één enkele dosis te geven, kan deze in kleinere porties worden verdeeld, waarbij niet meer dan 24 uur tussen de eerste en laatste toediening mag liggen. Na toediening van de teststof kunnen de dieren nog 3 tot 4 uur zonder voedsel worden gelaten. Als één dosis bij gedeelten over een bepaalde periode wordt toegediend, kan het nodig zijn om de dieren gedurende de doseringsperiode van voedsel en water te voorzien.

Na de toediening worden systematisch waarnemingen gedaan en geregistreerd. Dit moet voor ieder dier individueel worden gedaan. Tijdens de eerste dag moeten regelmatig waarnemingen worden verricht.

Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. Andere waarnemingen moeten iedere dag worden gedaan waarbij ervoor gezorgd moet worden dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bij voorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren. Bij het observeren van de dieren moet in ieder geval aandacht besteed worden aan veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremoren, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt, moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd.

Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die op het einde van de test nog leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

Bepaling van de toxiciteit bij het andere geslacht

Na het voltooiën van de studie met het ene geslacht, moet ten minste één groep van 5 dieren van het andere geslacht worden blootgesteld aan de stof om te verzekeren dat dieren van dit geslacht niet duidelijk gevoeliger zijn voor de teststof. In bepaalde gevallen kan een motivering worden gegeven voor het gebruik van minder dieren. Wanneer voldoende informatie beschikbaar is om aan te tonen dat dieren van het geteste geslacht duidelijk gevoeliger zijn, kan het testen van het andere geslacht achterwege worden gelaten.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat : het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood bij de individuele dieren intrad, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald en genoteerd kort voordat teststof wordt toegediend, vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij hun dood. Veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van proefstof gerelateerde ongemak of nood en pijn, worden geregistreerd als gestorven als gevolg van toediening van de stof. Door middel van een erkende methode kan de LD₅₀ worden bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en indien waargenomen het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

3. RAPPORTAGE**3.1. Verslag van de proefnemingen**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enz.;
- proefomstandigheden;
- dosisniveau (met het eventuele medium en de concentraties);
- het geslacht van de blootgestelde dieren;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef sterft of wordt gedood, het aantal dat intoxicatieverschijnselen vertoont; het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;
- alle waarnemingen;
- de LD₅₀ van het geslacht dat het volledige onderzoek onderging, bepaald na 14 dagen (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- het 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de LD₅₀ (waar dit gegeven kan worden);
- dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingmethode mogelijk is);
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- resultaten van de test die eventueel op het andere geslacht werd uitgevoerd;
- bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient gegeven te worden aan het effect dat het op humane wijze doden van dieren tijdens de test zou kunnen hebben op de berekende LD₅₀-waarde);
- interpretatie van de resultaten.

3.2. Evaluatie en interpretatie

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

:

B.1 bis. ACUTE ORALE TOXICITEIT—VASTE-DOSISMETHODE**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De acute orale toxiciteitstest verstrekt gegevens over de nadelige effecten die, binnen korte tijd, op het innemen van een enkele dosis van de teststof kunnen volgen.

De vaste-dosismethode wordt in twee fasen uitgevoerd.

In een voorstudie worden de effecten van verschillende oraal, met een maagsonde, toegediende doses op dieren van één geslacht sequentiëel onderzocht. Deze voorstudie verstrekt informatie over de relatie tussen dosis en toxiciteit, alsmede een schatting van de minimale letale dosis. Gewoonlijk worden in deze fase niet meer dan 5 dieren onderzocht.

Gedurende het hoofdonderzoek wordt de stof op één van de vooraf bepaalde dosisniveaus (5, 50, 500 of 2 000 mg/kg) oraal, met behulp van een maagsonde, aan groepen van 5 mannetjes en 5 wijfjes toegediend. De gebruikte dosis wordt in de voorstudie bepaald en is de dosis waarvan verwacht wordt dat die "evidente intoxicatie" veroorzaakt (zie 1.2. Definities), maar geen sterfte.

Na de toediening worden waarnemingen van de effecten gedaan.

Wanneer het eerst gekozen dosisniveau duidelijke intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende mortaliteit, is het niet nodig de proef voort te zetten.

Wanneer op het gekozen dosisniveau geen evidente intoxicatie wordt waargenomen, dient de stof op het volgende hogere dosisniveau te worden getest. Wanneer dieren sterven of wanneer een ernstige toxische reactie het noodzakelijk maakt dieren op een humane wijze te doden, dient de stof bij het naast gelegen lagere dosisniveau te worden getest.

Deze procedure maakt de identificatie mogelijk van de « discriminerende dosis » (zie 1.2. Definities), dat wil zeggen het hoogste van de vooraf vastgestelde niveaus van de doses die kunnen worden toegediend zonder sterfte te veroorzaken (inclusief het pijnloos doden van proefdieren).

Dieren die verschijnselen van ernstige en aanhoudende angst en pijn vertonen, mogen op een humane wijze gedood worden. Het doseren van teststoffen op een wijze waarvan bekend is dat het als gevolg van corrosieve of irriterende eigenschappen duidelijke ernstige nood en pijn veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

1.6.1.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten.

De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Voor ieder geslacht mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

Vóór de test worden de dieren ten minste vijf dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden als van de proef gehouden. Voor de test worden gezonde, jonge volwassen dieren steekproefsgewijs geselecteerd en in de behandelingsgroepen van de voorstudie en het hoofdonderzoek ingedeeld. In de praktijk zal voor het hoofdonderzoek, slechts één groep van elk geslacht nodig zijn.

1.6.1.2. Dosisbereiding en -toediening

Zo nodig wordt de teststof in een geschikt medium opgelost of gesuspenderd. Het verdient aanbeveling om eerst gebruik te maken van een oplossing in water. Als dat niet mogelijk is kan achtereenvolgens plantaardige olie of een ander middel worden overwogen als oplosmiddel of om de stof in te suspenderen. Van niet-waterige media moeten de toxische eigenschappen bekend zijn; als dit niet het geval is moeten deze eigenschappen vóór of tijdens de test worden vastgesteld. Bij knaagdieren mag het maximale volume dat voor de proef wordt gebruikt normaliter niet groter zijn dan 10 ml/kg lichaamsgewicht, behalve bij oplossingen in water waarvan het voor de proef gebruikte volume maximaal 20 ml/kg mag bedragen. De spreiding in het volume moet zo klein mogelijk worden gehouden door de concentratie zodanig aan te passen dat bij alle dosisniveaus een constant volume wordt gewaarborgd.

Vóór de toediening van de teststof dient aan de dieren voeding te worden onthouden. Aan ratten wordt in de nacht vóór de test geen voedsel verstrekt; water is niet aan beperkingen onderworpen. De volgende dag dienen de dieren te worden gewogen. Vervolgens wordt de teststof in één enkele dosis per maagsonde toegediend. Als het niet mogelijk is de teststof in één enkele dosis toe te dienen, kan deze in kleinere porties, verdeeld gedurende een periode van ten hoogste 24 uur, worden gegeven. Nadat de teststof is toegediend, kunnen de dieren nog drie of vier uur zonder voedsel worden gelaten. Als een dosis in kleinere porties verdeeld over een bepaalde periode wordt toegediend, kan het nodig zijn de dieren, afhankelijk van de lengte van die periode, van voedsel en water te voorzien.

1.6.2. Uitvoering

1.6.2.1. Voorstudie

De effecten van verschillende doses worden op individuele dieren onderzocht. Hiervoor gebruikt men normaliter wijfjes, tenzij er aanduidingen zijn dat mannetjes gevoeliger zijn. De doses worden sequentiële toegediend, dat wil zeggen de tijd tussen toediening van de dosis aan een volgend dier dient ten minste 24 uur te zijn. Bij alle dieren wordt zorgvuldig gelet op tekenen van toxiciteit, gedurende een periode van ten minste zeven dagen. Wanneer tekenen van matige toxiciteit na zeven dagen aanwezig blijven, dient het dier gedurende een verdere periode van zeven dagen te worden geobserveerd. De volgende dosisniveaus kunnen worden toegepast : 5, 50, 500 en 2 000 mg/kg. Wanneer de eerste gekozen dosis geen ernstige toxiciteit veroorzaakt, en de volgende hogere dosis sterfte veroorzaakt, kan het nodig zijn één of meer tussen gelegen dosisniveaus te onderzoeken. Hiermee moet het mogelijk zijn informatie te verzamelen over het (de) dosisniveau(s) die tekenen van toxiciteit veroorzaakt (veroorzaken) evenals over het laagste dosisniveau dat mortaliteit veroorzaakt.

Gestreefd dient te worden naar het selecteren van het eerste dosisniveau aan de hand van kennis over verwante chemische stoffen. Wanneer deze informatie ontbreekt, wordt aanbevolen 500mg/kg als eerste dosis te gebruiken. Wanneer geen tekenen van toxiciteit bij het eerste dosisniveau waargenomen worden, kan het volgende hogere dosisniveau onderzocht worden. Wanneer geen mortaliteit bij 2 000 mg/kg optreedt, is het vooronderzoek beëindigd en zal het hoofdonderzoek bij dat dosisniveau moeten worden gestart. Wanneer de dieren op humane wijze gedood moeten worden, als gevolg van ernstige effecten die door het eerste dosisniveau (bij voorbeeld 500 mg/kg) veroorzaakt worden, dient het naast gelegen lagere dosisniveau (bij voorbeeld 50 mg/kg) aan een ander dier te worden toegediend. Wanneer dit dier blijft leven, kunnen tussenliggende dosisniveaus aan andere dieren worden toegediend. Gewoonlijk worden niet meer dan vijf dieren in deze procedure gebruikt.

1.6.2.2. Hoofdonderzoek

Voor ieder te onderzoeken dosisniveau dienen tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) te worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger.

Een principieel onderdeel van de vaste-dosismethode is dat alleen matig toxische doses worden gebruikt. Het toedienen van dodelijke doses van de teststof moet worden vermeden.

Het bij de proef te gebruiken dosisniveau dient te worden geselecteerd uit vier vaste-dosisniveaus, te weten 5, 50, 500 of 2 000 mg/kg lichaamsgewicht. Het eerste dosisniveau dat gekozen wordt, is het niveau waarvan verwacht wordt dat het evidente intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende mortaliteit (inclusief het noodzakelijk geworden humane doden, toevallige sterfgevallen tellen niet mee maar dienen wel te worden geregistreerd). Wanneer dit dosisniveau evidente intoxicatie veroorzaakt, maar geen met de teststof verband houdende mortaliteit, is verder testen niet nodig.

Wanneer als gevolg van de toediening van het geselecteerde dosisniveau geen evidente intoxicatie optreedt, dient de stof opnieuw te worden getest op het volgende hogere dosisniveau. De dieren moeten echter onder observatie worden gehouden tot de observatieperiode is afgelopen. Wanneer dieren humaan moeten worden gedood in verband met een ernstige toxische reactie, of bij mortaliteit, die verband houdt met de teststof, dient de stof op het naast gelegen lagere dosisniveau te worden getest. Ook nu dienen dieren, die niet behoeven te worden gedood, de volledige observatieperiode onder observatie te worden gehouden.

Na de toediening worden waarnemingen gedaan. Deze worden systematisch geregistreerd. Dit dient voor ieder dier afzonderlijk te geschieden.

De observatieperiode moet minstens 14 dagen duren. De duur van de observatie kan echter niet dwingend worden voorgeschreven. Zij is afhankelijk van de toxische reacties, de snelheid waarmee deze ontstaan en de duur van het herstel; de periode kan dus zo nodig worden verlengd. Van belang is het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen voor het eerst worden waargenomen en weer verdwijnen, alsmede het tijdstip waarop de dood intreedt, vooral wanneer de mogelijkheid bestaat dat de intoxicatieverschijnselen pas laat zichtbaar worden.

Er dient een zorgvuldig klinisch onderzoek plaats te vinden en wel twee keer op de dag van het toedienen van de dosis en minstens één keer per dag daarna. Dieren die duidelijk pijn lijden of ernstige tekenen van angst vertonen dienen humanaan te worden gedood. De eerste dagen na het toedienen van de testdosis zijn aanvullende waarnemingen noodzakelijk indien de dieren tekenen van intoxicatie blijven vertonen. De proef kan worden beëindigd indien het duidelijk wordt dat het gekozen dosisniveau te hoog was.

Er dient gelet te worden op veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedragspatroon. Bijzondere aandacht dient te worden besteed aan de waarneming van tremoren, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma.

Het gewicht van elk individueel dier dient te worden vastgesteld kort voordat de teststof wordt toegediend, vervolgens dagelijks de daarop volgende drie dagen en daarna wekelijks. De dieren die tijdens de proef sterven en zij die tot het einde van de proef in leven blijven worden gewogen. Vervolgens wordt op hen necropsie verricht. Alle macroscopische waarneembare pathologische veranderingen dienen te worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, dient weefsel verzameld te worden voor histopathologisch onderzoek.

Het onderzoek van een tweede of, in uitzonderlijke gevallen, van een derde dosisniveau kan, afhankelijk van de resultaten van het voorafgaande dosisniveau, noodzakelijk zijn.

Wanneer een stof mortaliteit veroorzaakt bij 5 mg/kg lichaamsgewicht (of wanneer de voorstudie aangeeft dat bij dat dosisniveau mortaliteit op zal treden) kan nader onderzoek naar de acute toxiciteit van de stof plaatsvinden.

2. GEGEVENS

Gegevens uit zowel de voorstudie als het hoofdonderzoek dienen voor elk getest dosisniveau in tabellen te worden samengevat, waarin is weergegeven: het aantal dieren aan het begin van de test, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal dieren dat tijdens de test is gestorven of humanaan moest worden gedood, een beschrijving van de toxische effecten en, voor het hoofdonderzoek, vermelding of evidente intoxicatie welke verband houdt met de teststof is waargenomen, het verloop in de tijd van eventuele toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Veranderingen in het gewicht van de dieren die langer dan één dag in leven blijven, worden berekend en genoteerd.

Dieren die humanaan moeten worden gedood vanwege ernstige angst en pijn, welke verband houdt met de teststof, worden geregistreerd als dieren die door de teststof zijn gestorven.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In dit verslag dienen, voor zover mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen voor zowel de voorstudie als het hoofdonderzoek:

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enz.;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentratie);
- volledige resultaten van alle onderzochte dosisniveaus;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten naar geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen aantal gebruikte dieren, veranderingen in lichaamsgewicht, eventueel aantal dieren dat tijdens de proef is gestorven of moest worden gedood, aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, aard, ernst en duur van de effecten);
- tijdverloop van de eerste tekenen van intoxicatie en eventuele reversibiliteit van deze effecten;
- wanneer dieren gestorven of gedood zijn, het tijdstip van sterven na de toediening van de stof, alsmede redenen en criteria voor het humanaan doden van dieren;
- necropsiebevindingen;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten, met inbegrip van de verschijnselen van evidente intoxicatie en het bij de proef vastgestelde discriminerende dosisniveau.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

DOSIS	RESULTATEN	INTERPRETATIE
5 mg/kg lichaamsgewicht	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die ZEER TOXISCH zijn
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie Teststoffen die TOXISCH zijn	
50 mg/kg lichaamsgewicht	100 % overlevende diere geen evidente intoxicatie	Zie resultaten bij 50 mg/kg
	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die mogelijk TOXISCH of ZEER TOXISCH zijn. Zie resultaten bij 5 mg/kg
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie	Teststoffen die SCHADELIJK zijn
500 mg/kg lichaamsgewicht	100 % overlevende dieren, geen evidente intoxicatie Zie resultaten bij 500 mg/kg	
	Minder dan 100 % overlevende dieren	Teststoffen die mogelijk TOXISCH of SCHADELIJK zijn. Zie resultaten bij 50 mg/kg
	100 % overlevende dieren doch evidente intoxicatie	Teststoffen die geacht worden geen significante acute toxiciteit te bezitten
	100 % overlevende dieren, geen evidente intoxicatie Zie resultaten bij 2 000 mg/kg	
2 000 mg/kg lichaamsgewicht	Minder dan 100 % overlevende dieren	Zie resultaten bij 500 mg/kg
	100 % overlevende dieren met of zonder evidente intoxicatie	Teststoffen zonder significante acute toxiciteit

Zie ook algemeen inleiding deel B (D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (E).

B.2. ACUTE INHALATIETOXICITEIT

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het is nuttig om over oriënterende informatie te beschikken ten aanzien van de deeltjesgrootte, de dampspanning, het smeltpunt, het kookpunt, het vlampunt en het ontploffingsgevaar (indien van toepassing) van de te onderzoeken stof.

Zie ook algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een vastgestelde periode aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt één concentratie per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de studie leven, wordt necropsie verricht.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van angst en pijn vertonen, zouden op humane wijze moeten worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van corrosieve of ernstig irriterende eigenschappen pijn en ongemak veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde jonge dieren worden op een willekeurige manier vóór de behandeling in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Het is niet nodig de dieren aan een gesimuleerde blootstelling te onderwerpen, tenzij dit wenselijk is bij het type expositieapparatuur dat wordt gebruikt.

Vaste teststoffen moeten eventueel worden gemicroniseerd om deeltjes van geschikte grootte te verkrijgen.

Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd, ten einde de juiste concentratie van de proefstof in de atmosfeer te bereiken; in dat geval moet ook een mediumcontrolegroep worden toegevoegd. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. De proef dient te worden uitgevoerd met een rattenstam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder concentratieniveau moeten ten minste tien knaagdieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn.

Opmerking : In acute-toxiciteitstesten met dieren van een hogere orde dan knaagdieren dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen. De doses dienen zorgvuldig te worden gekozen en alle moeite dient te worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke testen dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

1.6.2.3. Blootstellingsconcentraties

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) expositieconcentraties worden gebruikt die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. De gegevens moeten voldoende zijn om een concentratie/respons-curve te verkrijgen en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een LC₅₀ te bepalen.

1.6.2.4. Limiettest

Als binnen een periode van 14 dagen geen sterfte wordt veroorzaakt door de expositie gedurende 4 uur van vijf mannelijke en vijf vrouwelijke proefdieren aan 20 mg/l in de vorm van een gas of aan 5 mg/l in de vorm van een vloeistofaërosol of van een stofaërosol, is het wellicht niet noodzakelijk verdere proeven te nemen. Indien de test echter bij voornoemde concentraties ten gevolge van de fysische of chemische eigenschappen van de teststof waaronder ook de explosieve eigenschappen worden gerekend niet kan worden uitgevoerd, moet in plaats van die concentraties de maximaal mogelijke concentratie worden gebruikt.

1.6.2.5. Blootstellingstijd

De blootstellingstijd bedraagt 4 uur.

1.6.2.6. Apparatuur

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig gebouwd is dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste 12 luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de meststoffen in de atmosfeer. Als van een expositiekamer gebruik wordt gemaakt moet deze op een zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk bij elkaar kunnen kruipen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt, dat het totale « volume » van de proefdieren niet meer mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kunnen de dieren oronasaal, alleen met hun kop of individueel met hun hele lijf aan de testlucht worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

1.6.2.7. Observatieperiode

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet door de toxische reacties het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst zijn waargenomen het tijdstip waarop zij weer verdwijnen en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat op een uitgestelde dood.

1.6.3. Uitvoering

Kort vóór de blootstelling worden de dieren gewogen en vervolgens 4 uur lang aan de testconcentratie blootgesteld in het daarvoor bestemde apparaat na evenwichtinstelling van de concentratie in de blootstellingskamer. De evenwichtinstelling mag niet veel tijd in beslag nemen. Tijdens de proef dient de temperatuur op 22 °C ± 3 °C te worden gehouden. In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden behalve waar die niet goed uitvoerbaar is (bijvoorbeeld bij het testen van sommige aërosolen). Het onderhouden van een lichte onderdruk (≤ 5 mm water) voorkomt het weglekken van de teststof naar de omgeving. Gedurende de blootstelling worden de dieren voedsel en water onthouden. Om de testatmosfeer te genereren en concentratiemetingen uit te voeren dienen geschikte systemen gebruikt te worden. Het systeem moet de waarborg bieden dat de expositieomstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn. De kamer moet zo ontworpen en bediend kunnen worden dat een homogene verdeling van de testatmosfeer binnen de kamer wordt gehandhaafd.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gemonitord :

(a) de luchtdoorstromingssnelheid (continu) (luchtdebiet);

(b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren, ten minste driemaal gemeten tijdens de blootstelling (sommige atmosferen, bijvoorbeeld aërosolen met hoge concentratie moeten eventueel vaker worden gecontroleerd). Tijdens de blootstelling mag de concentratie niet meer dan ± 15 % van het gemiddelde afwijken. Bij sommige aërosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Voor aërosolen moet zo dikwijls als noodzakelijk is (ten minste éénmaal per testgroep) een analyse worden uitgevoerd om de verdeling van de deeltjesgrootte te bepalen;

(c) de temperatuur en de vochtigheid; indien mogelijk continu.

Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor ieder individueel dier worden geregistreerd. Tijdens de eerste dag moeten frequent waarnemingen worden verricht. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht; overige waarnemingen moeten iedere dag worden gedaan waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren moet in ieder geval aandacht worden besteed aan veranderingen van huid, vacht, ogen, slijmvliezen, ademhalingsorganen, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van het ademhalingsgedrag, tremoren, convulsies, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt, moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Het gewicht van ieder dier wordt na de expositie éénmaal per week en bij de dood van de dieren bepaald.

Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht, waarbij vooral aandacht wordt besteed aan veranderingen in het bovenste en onderste gedeelte van de ademhalingswegen. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat : aantal dieren bij het begin van het onderzoek, tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere toxiciteitsverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Veranderingen in het gewicht moeten worden berekend en geregistreerd indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van angst en pijn in verband met de stofblootstelling worden geregistreerd als gestorven in verband met de stofblootstelling. Met behulp van een erkende methode wordt de LC_{50} bepaald. Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxische effecten.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden : Beschrijving van de expositieapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het genereren van aerosolen, methode van luchtconditionering en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht (als deze gebruikt is). Er moet een beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid, de concentraties en de verdeling van de deeltjesgrootte van het aerosol;

Gegevens betreffende de expositie :

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bijvoorbeeld standaardafwijking). Zij dienen, indien mogelijk, te omvatten :

- (a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) door de inhalatieapparatuur;
- (b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
- (c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
- (d) aard van het eventuele medium;
- (e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
- (f) massa-mediaan van de aërodynamische diameter (MMAD) en de geometrische standaard afwijking (GSD);
- (g) duur van de evenwichtinstelling;
- (h) duur van de expositie;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en concentratieniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef stierf of gedood werd, het aantal dieren dat toxische verschijnselen vertoonde, het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip gedurende of na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;
- alle waarnemingen;
- de LC_{50} voor beide geslachten bepaald aan het eind van de observatieperiode (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de LC_{50} (waar dit gegeven kan worden);
- dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingmethode mogelijk is);
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient te worden besteed aan het effect van het op humane wijze doden van dieren tijdens de proeven op de berekende LC_{50});
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.3. ACUTE DERMAL TOXICITEIT

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Vervolgens worden de symptomen en sterfte waargenomen. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van nood en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood. Het doseren van teststoffen op een manier waarvan bekend is dat deze als gevolg van bijtende of irriterende eigenschappen pijn en nood veroorzaakt, behoeft niet te worden uitgevoerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren in hun proefkooien ten minste 5 dagen onder dezelfde huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef. Gezonde, jong volwassen dieren worden op een willekeurige manier voor de behandeling in groepen ingedeeld. Ongeveer 24 uur voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd; bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast, omdat daardoor de doorlaatbaarheid van de huid zou kunnen veranderen. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot een poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de mate waarin de huid de teststof doorlaat. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten of konijnen. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzakelijkheid hiervan moet worden gerechtvaardigd. De proef dient te worden uitgevoerd met een stam die gewoonlijk in laboratoria wordt gebruikt. Per geslacht mag bij het begin van de studie het gewicht van de dieren die worden gebruikt, niet meer dan 20 % van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste 5 knaagdieren worden gebruikt. Zij dienen van hetzelfde geslacht te zijn. Indien wijfjes worden gebruikt, moeten deze nullipaar zijn en niet zwanger. Indien informatie beschikbaar is die aantoonbaar dat één van beide geslachten duidelijk gevoeliger is, dienen dieren van dit geslacht gebruikt te worden.

Opmerking : In onderzoeken naar acute toxiciteit met dieren van een hogere orde dan knaagdieren, dienen kleinere aantallen in overweging te worden genomen. De doses dienen zorgvuldig te worden uitgekozen, en alle moeite dient te worden gedaan om matig toxische doses niet te boven te gaan. In dergelijke testen dient toediening van letale doses van de teststof te worden vermeden.

1.6.2.3. Dosisniveaus

Bij de proeven moeten voldoende (ten minste drie) dosisniveaus worden toegepast die zodanig onderling verschillen dat proefgroepen worden verkregen met duidelijke verschillen in toxische effecten en sterftecijfers. Bij de vaststelling van de dosisniveaus moet rekening worden gehouden met alle mogelijke irriterende of corrosieve effecten. De gegevens moeten voldoende zijn om een dosis/respons-curve te maken en om, indien mogelijk, op aanvaardbare wijze een LD₅₀ te bepalen.

1.6.2.4. Limiettest

Een limiettest met één dosis van ten minste 2 000 mg/kg lichaamsgewicht wordt uitgevoerd op een groep van 5 mannetjes en 5 wijfjes, met behulp van de hierboven beschreven testmethode. Indien sterfte wordt vastgesteld die met de teststof verband houdt, moet het uitvoeren van een volledig testprogramma overwogen worden.

1.6.2.5. Observatieperiode

De observatieperiode moet ten minste 14 dagen bedragen. Deze duur van de observatie moet echter niet als een streng vastgelegde periode beschouwd worden, maar moet door de toxische reacties, het tijdstip waarop deze voor het eerst worden waargenomen en de duur van het herstel worden bepaald; de observatieperiode kan dus, indien noodzakelijk, worden verlengd. Van belang zijn het tijdstip waarop intoxicatieverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, hun duur en het tijdstip waarop de dood intreedt, in het bijzonder wanneer de kans bestaat voor een vertraagde sterfte.

1.6.3. Uitvoering

Ieder dier moet individueel in een kooi worden gehuisvest. De teststof wordt gelijkmatig verdeeld over een oppervlak van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen mag het te behandelen oppervlak kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en zo gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de expositietijd van 24 uur door middel van poreus verbandgaas en niet-irriterend plakband in contact met de huid blijven. Het behandelde gedeelte van de huid moet op een geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof langs orale weg opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren, kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren.

Aan het eind van de expositieperiode wordt de resterende teststof — zo mogelijk met water — van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

De gedane waarnemingen moeten systematisch worden geregistreerd voor ieder individueel dier. Tijdens de eerste dag worden de dieren regelmatig geobserveerd. Ten minste één keer per werkdag moet een zorgvuldig klinisch onderzoek worden verricht. De andere waarnemingen moeten iedere dag worden verricht, waarbij erop moet worden toegezien dat er zo weinig mogelijk dieren voor het onderzoek verloren gaan, bijvoorbeeld door necropsie of koeling van dood aangetroffen dieren en door afzondering of opoffering van zwakke of stervende dieren.

Bij het observeren wordt aandacht besteed aan veranderingen van vacht, behandelde huid, ogen, slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Er moet bijzondere aandacht worden besteed aan de waarneming van tremoren, speekselvloed, diarree, lethargie, slaap en coma. Het tijdstip waarop de dood intreedt moet zo nauwkeurig mogelijk worden geregistreerd. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het einde van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht. Alle macroscopisch waarneembare pathologische veranderingen worden geregistreerd. Als hiertoe aanleiding bestaat, worden weefselmonsters genomen voor histopathologisch onderzoek.

Bepaling van de toxiciteit bij het andere geslacht

Na het voltooiën van de studie voor het ene geslacht, moet ten minste een groep van 5 dieren van het andere geslacht worden blootgesteld aan de stof om te verzekeren dat dit geslacht niet duidelijk gevoeliger is voor de teststof. In bepaalde gevallen kunnen redenen bestaan voor het gebruik van minder dieren. Indien voldoende informatie beschikbaar is om aan te tonen dat dieren van het geteste geslacht duidelijk gevoeliger zijn, mag het testen van het andere geslacht achterwege worden gelaten.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat : het aantal dieren bij het begin van het onderzoek, het tijdstip waarop de dood intreedt bij de individuele dieren, het aantal dieren dat andere intoxicatieverschijnselen vertoont, een beschrijving van de toxische effecten en de bevindingen bij de necropsie. Het gewicht van ieder individueel dier wordt bepaald kort voordat de teststof wordt aangebracht, en vervolgens één keer iedere week en ten slotte bij zijn dood; veranderingen in het gewicht worden berekend en geregistreerd, indien de dieren langer dan één dag in leven blijven. Dieren die op humane wijze gedood worden omwille van nood of ongemak van pijn in verband met de stof, worden geregistreerd als gestorven in verband met de stof. De LD₅₀ moet door middel van een erkende methode worden bepaald.

Bij de evaluatie van de gegevens moet ook aandacht worden besteed aan het eventuele verband dat bestaat tussen de blootstelling van de dieren aan de teststof en het aantal en de ernst van alle voorkomende afwijkingen, waaronder gedrags- en klinische afwijkingen, macroscopisch waarneembare beschadigingen, veranderingen in het lichaamsgewicht, sterfte en eventuele andere toxicologische effecten.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (met vermelding van de wijze waarop de huid is schoongemaakt en het soort verband : occlusief of niet occlusief);
- dosisniveaus (met het eventuele medium en de concentraties);
- het geslacht van de blootgestelde dieren;
- tabellarische gegevens betreffende de effecten per geslacht en dosisniveau (dat wil zeggen het aantal dieren dat tijdens de proef stierf of gedood werd, het aantal dieren dat intoxicatieverschijnselen vertoont, het aantal blootgestelde dieren);
- het tijdstip na de blootstelling waarop de dood intreedt, redenen en criteria voor het op humane wijze doden van dieren;
- alle waarnemingen;
- de LD₅₀ van het geslacht dat het volledige onderzoek onderging, bepaald na 14 dagen (waarbij de berekeningsmethode dient te worden omschreven);
- 95 %-betrouwbaarheidsinterval voor de LD₅₀ (waar dit gegeven kan worden);
- dosis/sterfte-curve met helling (indien dit bij de gebruikte bepalingmethode mogelijk is);
- bevindingen bij de necropsie;
- eventuele histopathologische bevindingen;
- resultaten van de test die eventueel op het andere geslacht werd uitgevoerd;
- bespreking van de resultaten (speciale aandacht dient besteed te worden aan het effect dat het op humane wijze doden van dieren tijdens de proeven zou kunnen hebben op de berekende LD₅₀);
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.4. ACUTE TOXICITEIT (HUIDIRRITATIE)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Inleidende overwegingen

Voldoende aandacht dient gegeven te worden aan alle beschikbare gegevens over de te onderzoeken stof teneinde het testen van stoffen onder omstandigheden die ernstige reacties teweeg kunnen brengen te minimaliseren. De volgende informatie kan van nut zijn om te bepalen of een volledige test, een studie met één enkel dier, of geen verdere test moet worden uitgevoerd.

i) Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit. Voor sterk zure of basische stoffen (bijvoorbeeld met een pH van kleiner of gelijk aan 2 of groter of gelijk aan 11,5) behoeven wellicht geen onderzoeken te worden uitgevoerd op primaire huidirritatie als bijtende eigenschappen verwacht kunnen worden. Ook dient rekening gehouden te worden met de basische of zure reserve.

ii) Indien overtuigende gegevens voor ernstige effecten uit goedgevalideerde *in vitro* testen beschikbaar zijn, is een volledige test eventueel niet vereist.

iii) Resultaten van acute toxiciteitsstudies. Indien een test op de acute toxiciteit langs dermale weg is uitgevoerd met de limietdosis van de stof (2 000 mg/kg lichaamsgewicht), en hierbij geen huidirritatie werd waargenomen, kan verder testen op huidirritatie onnodig zijn. Voorts is het testen van stoffen, waarvan werd aangetoond dat zij uiterst toxisch zijn langs dermale weg, onnodig.

De teststof wordt in één enkele dosis op de huid van verschillende proefdieren aangebracht. Ieder dier wordt als zijn eigen controle gebruikt. De graad van irritatie wordt na een bepaald tijdsverloop afgelezen en geregistreerd en wordt uitvoerig beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

Dieren die hevige en voortdurende tekenen van nood of ongemak en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Ongeveer 24 uur voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren door knippen of scheren verwijderd.

Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast. Alleen dieren met een gezonde en gave huid mogen worden gebruikt.

Sommige konijnstammen hebben plekken met dichte haargroei, die in bepaalde perioden van het jaar meer op de voorgrond treden. De teststoffen mogen niet op deze zones met dichte haargroei worden aangebracht.

Bij een proef met vaste stoffen (die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt) moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Als van een medium gebruik wordt gemaakt, moet rekening worden gehouden met de invloed hiervan op de irritatie van de huid door de teststof. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Hoewel er verschillende soorten zoogdieren gebruikt kunnen worden, is het albino konijn de soort die de voorkeur heeft.

1.6.2.2. Aantal dieren

Indien op grond van *in vitro*-screeningsresultaten of andere overwegingen wordt vermoed dat de teststof necrose zou kunnen veroorzaken (d.w.z. bijtend zou kunnen zijn), moet een test met één enkel dier worden overwogen. Als de resultaten van deze test niet wijzen op bijtende eigenschappen, moet het onderzoek vervolledigd worden met behulp van ten minste twee extra dieren.

Voor het volledige onderzoek worden ten minste drie gezonde volwassen dieren gebruikt. Er behoeven geen afzonderlijke dieren te worden gebruikt voor een onbehandelde controlegroep. Extra proefdieren kunnen vereist zijn ter opheldering van moeilijk te interpreteren resultaten.

1.6.2.3. Dosisniveau

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt een dosis van 0,5 ml vloeistof of 0,5 g vaste of semi-vaste stof op het testgedeelte van de huid aangebracht. De onbehandelde huid dient als controle voor de test.

1.6.2.4. Observatieperiode

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd, maar moet lang genoeg zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de geobserveerde effecten ten volle te kunnen beoordelen. De observatieperiode hoeft in de regel echter niet langer te duren dan 14 dagen vanaf de datum van de applicatie.

1.6.3. Uitvoering

De dieren moeten individueel in kooien worden gehuisvest. De teststof wordt aangebracht op een klein huidoppervlak (circa 6 cm²) en de plek wordt met gaas bedekt dat met behulp van niet-irriterend plakband op zijn plaats wordt gehouden. Bij gebruik van vloeistof of vloeibare pasta kan het nodig zijn de vloeistof eerst op het gaas aan te brengen en het gaas daarna op de huid te leggen. Het gaas moet voor de duur van de expositie in aanraking met de huid blijven door middel van een geschikt occlusief- of semi-occlusief verband. Er moet tevens voor worden gezorgd dat het dier niet in contact komt met het verband om opname van de teststoffen via de mond of door inhalatie te voorkomen.

Aan het einde van de blootstellingsperiode moet de resterende teststof zo mogelijk worden verwijderd met water of met een geschikt oplosmiddel zonder het bestaande effect of de toestand van de opperhuid te wijzigen.

De expositie duurt gewoonlijk 4 uur.

Indien vermoed wordt dat de stof necrose kan veroorzaken (bijvoorbeeld als deze een bijtende werking heeft) moet de expositieduur beperkt worden (bijvoorbeeld tot 1 uur of 3 minuten). Dergelijke testen kunnen ook in eerste instantie met één dier worden uitgevoerd, indien dit niet uitgesloten is door de acute dermale toxiciteit van de teststof, drie patches (gaasjes) tegelijkertijd aan te brengen bij dit dier. Het eerste gaasje wordt verwijderd na drie minuten. Indien geen ernstige huidreactie wordt waargenomen, wordt na één uur het tweede gaasje verwijderd. Indien de observaties in dit stadium aantonen dat een vier uur durende blootstelling noodzakelijk is en op humane wijze kan worden uitgevoerd, wordt het derde gaasje verwijderd na vier uur en worden daarna de resultaten beoordeeld. In dit geval (d.w.z. wanneer een vier uur durende blootstelling mogelijk was), dient de test te worden vervolledigd met ten minste twee extra dieren, tenzij dit niet humaan geacht wordt (bijvoorbeeld als necrose wordt waargenomen na de vier uur durende blootstelling).

Indien na 3 minuten of één uur een ernstige reactie van de huid (bijvoorbeeld necrose) wordt waargenomen, wordt het onderzoek onmiddellijk beëindigd.

Onder bepaalde omstandigheden, bijvoorbeeld gezien het verwachte toepassings- en blootstellingspatroon van de mens, kan het nodig zijn de blootstelling te verlengen.

1.6.3.1. Observatie en scoring

De dieren moeten worden onderzocht op tekenen van erytheem en oedeem en de reacties moeten 60 minuten en vervolgens 24, 48 en 72 uur na de verwijdering van de patch (het gaasje) worden beoordeeld. De huidirritatie moet worden ingedeeld en geregistreerd volgens de in de tabel opgenomen schaal. Mogelijk moeten nog nadere waarnemingen worden verricht indien volledig herstel niet binnen de 72 uur is opgetreden. Behalve de waarneming van irritatie moeten eventuele ernstige beschadigingen zoals een bijtende werking (onomkeerbare vernietiging van huidweefsel) en andere toxische effecten volledig worden beschreven.

Technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen worden gebruikt om twijfelachtige reacties of effecten die worden verhuld door verkleuring van de huid door de teststof, op te helderen.

GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor ieder dier afzonderlijk in tabellen worden samengevat : irritatiescores voor erytheem en oedeem gedurende de observatieperiode, ernstige beschadigingen, graad en aard van de irritatie, het reversibele of irreversibele karakter van de letsels, bijtende werking en alle andere waargenomen toxische effecten moeten worden beschreven.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de belangrijkste fysisch-chemische eigenschappen van de gebruikte stof en de toegepaste techniek voor de ontharing en reiniging van de huid, alsmede het soort verband : occlusief of semi-occlusief);
- tabellarische rangschikking van de gegevens betreffende de irritatiereactie voor ieder afzonderlijk dier en voor iedere observatietijd (1, 24, 48, 72 uur, enzovoort, na verwijdering van het gaas);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige letsels waaronder bijtende werking;
- beschrijving van de graad en de aard van de waargenomen irritatie en van histopathologische bevindingen indien van toepassing;
- beschrijving van eventuele toxische effecten, andere dan huidirritatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

Aanhangsel

TABEL: HUIDREACTIESCHAAL

Vorming van erytheem en eschara

	Score
Geen erytheem	0
Zeer licht erytheem (nauwelijks zichtbaar)	1
Duidelijk begrensd erytheem	2
Matig tot ernstig erytheem	3
Ernstig erytheem (diepe roodheid) of korstvorming (wonden in de diepte) die aflezen van het erytheem onmogelijk maken	4

Oedeemvorming

Geen oedeem	0
Zeer licht oedeem (nauwelijks zichtbaar)	1
Licht oedeem (de randen van de zwelling zijn goed te onderscheiden door een duidelijke verhoging)	2
Matig oedeem (de randen zijn ongeveer 1 mm verhoogd)	3
Ernstig oedeem (de zwelling is meer dan 1 mm hoog en strekt zich uit tot buiten het behandelde gebied)	4

B.5. ACUTE TOXICITEIT (IRRITATIE VAN HET OOG)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Inleidende overwegingen

Voldoende aandacht dient gegeven te worden aan alle beschikbare gegevens over de te onderzoeken stof teneinde het testen van stoffen onder omstandigheden die ernstige reacties teweeg kunnen brengen te minimaliseren. De volgende informatie kan hiervoor van nut zijn.

i) Fysisch-chemische eigenschappen en chemische reactiviteit. Sterk zure of basische stoffen die, bijvoorbeeld in het oog een pH van kleiner of gelijk aan 2, of groter of gelijk aan 11,5 geven, behoeven wellicht niet te worden onderzocht als ernstig letsel verwacht kan worden. Tevens dient rekening gehouden te worden met de basische of zure reserve.

ii) Resultaten van goed gevalideerde alternatieve studies; stoffen waarvan is aangetoond dat zij potentieel bijtende of ernstig irriterende eigenschappen bezitten, dienen niet verder te worden getest op oogirritatie, daar kan worden aangenomen dat zulke stoffen ernstige effecten op de ogen zullen hebben in een test volgens deze methode.

iii) Resultaten uit huidirritatiestudies. Stoffen waarvan is aangetoond dat zij duidelijk bijtende of ernstige huidirriterende eigenschappen bezitten tijdens een huidirritatiestudie, dienen niet verder te worden getest op oogirritatie, daar kan worden verondersteld dat zulke stoffen ernstige effecten op de ogen zouden kunnen hebben.

De teststof wordt in één enkele dosis op één van de ogen van ieder van de verschillende proefdieren aangebracht; het onbehandelde oog dient als controle. De graad van irritatie wordt op bepaalde tijdstippen beoordeeld en genoteerd en wordt uitvoeriger beschreven om een volledige evaluatie van de effecten mogelijk te maken. De duur van de waarnemingen moet voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten ten volle te kunnen beoordelen.

Dieren die hevige en aanhoudende tekenen van nood/ongemak en pijn vertonen, moeten eventueel op humane wijze worden gedood.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Beide ogen van ieder voorlopig voor de test geselecteerd proefdier moeten in de loop van de 24 uur voor het begin van de test worden onderzocht. Dieren die lijden aan oogirritatie, oogaandoeningen of een reeds bestaand hoornvliesletsel, mogen niet worden gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Hoewel er diverse soorten proefdieren voor deze test gebruikt worden, wordt aanbevolen om bij de tests gebruik te maken van gezonde volwassen albino konijnen.

1.6.2.2. Aantal proefdieren

Een onderzoek met slechts één proefdier dient te worden overwogen indien duidelijke effecten kunnen worden voorzien. Indien de resultaten van deze test met één konijn suggereren dat de stof ernstig irriterend (reversibel effect) of bijtend (irreversibel effect) is voor het oog bij gebruik van de beschreven procedure, behoeven mogelijk geen verdere testen op oogirritatie op de volgende dieren te worden uitgevoerd. In bepaalde gevallen kan het verder testen met extra dieren nuttig zijn om specifieke aspecten te onderzoeken.

In andere gevallen dan een onderzoek met slechts één dier moeten ten minste drie dieren worden gebruikt. Het aantal proefdieren mag worden opgevoerd in geval van moeilijk te interpreteren resultaten.

1.6.2.3. Dosisniveau

Bij vloeistoffen wordt een dosis van 0,1 ml gebruikt. Bij vaste stoffen, pasta's en uit deeltjes samengestelde stoffen moet een volume van 0,1 ml of een gewicht van circa 0,1 g worden gebruikt (het gewicht moet altijd worden geregistreerd). Indien de teststof bestaat uit een vaste of korrelige stof, moet deze worden fijngemalen. Het volume van de deeltjes moet worden gemeten na deze eerst zacht te hebben samengepakt, bijvoorbeeld door het tikken met de maathouder.

Bij vloeistoffen in pomp-sprays of spuitbussen onder druk moet de vloeistof worden versproeid en 0,1 ml worden opgevangen en in het oog worden gedruppeld, zoals beschreven voor vloeistoffen.

1.6.2.4. Observatieperiode

De duur van de waarneming moet niet als een streng vastgelegde periode worden beschouwd. Ze moet echter voldoende lang zijn om het reversibele of irreversibele karakter van de waargenomen effecten te kunnen beoordelen, maar in de regel niet langer dan 21 dagen vanaf de toediening van de teststof.

1.6.3. UITVOERING

De dieren moeten individueel worden gehuisvest. Bij elk van de dieren wordt de teststof aangebracht in de bindvlieszak van één oog, waarbij het onderste ooglid voorzichtig van de oogbol wordt weggetrokken. De oogleden worden dan ongeveer één seconde zachtjes dichtgehouden om verlies van de teststof te voorkomen. Het andere oog, dat onbehandeld blijft, dient als controle.

Indien verwacht wordt dat de stof onredelijke pijn zou kunnen veroorzaken, mag een lokaal anestheticum worden gebruikt alvorens de te onderzoeken stof in te druppelen. Het soort, de concentratie en het tijdstip van toediening dienen zorgvuldig te worden gekozen om te verzekeren dat geen significante verschillen in reactie op de teststof optreden als gevolg van het gebruik van het lokale anestheticum. Het controle-oog dient op identieke wijze te worden verdoofd.

De ogen van de proefdieren mogen gedurende 24 uur na de toediening van de teststof niet worden uitgewassen. Na verloop van 24 uur kan dit zo nodig wel gebeuren.

Als uit de test blijkt dat een stof irriterend is, kunnen extra tests nodig zijn met gebruikmaking van konijnen waatvan de ogen kort na het indruppelen van de stof worden uitgespoeld. In deze gevallen wordt het gebruik van drie konijnen aanbevolen. Een halve minuut na de toediening worden de ogen van de konijnen een halve minuut lang uitgespoeld, waarbij het volume en de stroomsnelheid geen letsels mogen veroorzaken.

1.6.3.1. Observatie en scoring

De ogen moeten worden onderzocht na 1, 24, 48 en 72 uur. Als er na 72 uur geen oogletsels zijn, kan het onderzoek worden beëindigd.

Verlenging van de observatieperiode kan nodig zijn in geval van een blijvende aandoening van het hoornvlies of andere oogirritaties, ten einde te bepalen of deze beschadigingen erger worden en reversibel of irreversibel van aard zijn. Behalve de observatie van het hoornvlies, de iris en de bindvlieszen, moeten eventuele andere letsels die worden opgemerkt ook worden opgetekend en in het verslag worden vermeld. Bij ieder onderzoek moeten de oogreacties (tabel) worden beoordeeld en opgetekend. (De scoring van de oogreacties is voor verschillende interpretaties vatbaar. Ten behoeve van de testlaboratoria waar de proeven worden uitgevoerd en van degenen die de waarnemingen doen en interpreteren, kan een geulustreerde handleiding over oogirritaties gebruikt worden.)

Het onderzoek van de reacties kan worden vergemakkelijkt met behulp van een binoculaire loep, een hand-spleetlamp, een biomicroscop of andere geschikte instrumenten. Nadat de waarnemingen na 24 uur zijn geregistreerd, kunnen de ogen van sommige of alle konijnen verder worden onderzocht met behulp van fluoresceïne.

2. GEGEVENS

Voor ieder dier afzonderlijk moeten de irritatie-scores op de vastgestelde observatietijdstippen in tabellen worden samengevat. Een beschrijving van de graad en aard van de irritatie, aanwezigheid van ernstige beschadigingen en optreden van effecten anders dan aan de ogen moeten in het rapport worden vermeld.

3. RAPPORTAGE**3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden (inclusief de van belang zijnde fysisch-chemische eigenschappen van de teststof);
- tabel van irritatiereactie/bijtende werking van elk afzonderlijk dier op de verschillende observatietijdstippen (d.w.z. 1, 24, 48 en 72 uur);
- beschrijving van eventueel waargenomen ernstige beschadigingen;
- uitvoerige beschrijving van de graad en aard van de waargenomen irritatie of bijtende werking, met inbegrip van het betrokken gebied van de cornea, en het al dan niet reversibele karakter;
- beschrijving van de toegepaste methode voor het vaststellen van de irritatie na 1, 24, 48 en 72 uur (door hand-spleetlamp, biomicroscop, fluoresceïne);
- omschrijving van eventueel geconstateerde topicale effecten anders dan aan de ogen;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

*Aanhangsel***TABEL: OOGIRRITATIESCHAAL****Hoornvlies**

Opaciteit: graad van optische dichtheid (het gebied met de grootste dichtheid wordt beoordeeld)

Geen verzwering of opaciteit	0
Verspreide of diffuse opake gebieden (andere dan een lichte vertroebeling van de normale glans), de details van de iris zijn nog duidelijk zichtbaar	1
Duidelijk te onderscheiden opake gebied, de details van de iris zijn iets vervaagd	2
Parelmoerkleurige gebieden, details van de iris niet meer zichtbaar, de omvang van de pupil is nog nauwelijks te onderscheiden	3
Volledig opake hoornvlies, het regenboogvlies is nietmeer te onderscheiden	4

Iris

Normaal	0
Duidelijk verdiepte rugae, congestie, zwelling, matige circumcorneale hyperemie rondom het hoornvlies of injectie, één van deze verschijnselen of een combinatie ervan, waarbij de iris nog op licht reageert (een trage reactie is positief)	1
Geen reactie op licht, bloeding, verregaande weefselvernietiging (één of meerdere van deze verschijnselen)	2

Bindvlies

Roodheid (refereert naar het meest ernstige letsel van het bindvlies van de oogleden en oogbal in vergelijking tot het controleoog)

Bloedvaten normaal	0
Duidelijke hyperemie van sommige bloedvaten (geïnjecteerd)	1
Diffuse karmozijnrode verkleuring, afzonderlijke bloedvaten zijn niet gemakkelijk te onderscheiden	2
Diffuus vleeskleurig rood	3

Chemosis: oogleden en/of derde ooglid (membrana nictitans)

Geen zwelling	0
Zwelling, iets meer dan normaal (met inbegrip vanderde ooglid)	1
Duidelijke zwelling met gedeeltelijk uitpuilende oogleden	2
Zwelling met de oogleden ongeveer halfgesloten	3
Zwelling met oogleden voor meer dan de helft gesloten	4

B.6. SENSIBILISATIE VAN DE HUID**1. METHODE****1.1. INLEIDING***Opmerkingen :*

De gevoeligheid en het vermogen van een test om stoffen op te sporen met potentieel huidsensibiliserende eigenschappen bij de mens worden belangrijk geacht in een systeem voor de classificatie van toxische stoffen ten behoeve van de volksgezondheid.

Er bestaat géén enkele testmethode waarmee alle stoffen die de menselijke huid kunnen sensibiliseren, adequaat kunnen worden geïdentificeerd en die voor alle stoffen toepasselijk is.

Factoren zoals de fysische kenmerken van een stof, met inbegrip van het vermogen om in de huid binnen te dringen, moeten overwogen worden bij de keuze van een test.

Testen die gebruik maken van cavia's kunnen worden onderverdeeld in testen waarin gebruik wordt gemaakt van een adjuvans, waarbij een allergie wordt versterkt door het oplossen of suspenderen van de teststof in Freund's Compleet Adjuvans (FCA), en tests waarin geen adjuvans wordt gebruikt.

Proeven met adjuvans voorspellen een waarschijnlijk huidsensibiliserend effect van een stof bij mensen wellicht nauwkeuriger dan de methoden die geen gebruik maken van Freund's Compleet Adjuvans; deze methoden verdienen dan ook de voorkeur.

De Maximalisatietest met cavia's is een algemeen toegepaste test waarbij een adjuvans gebruikt wordt. Alhoewel verschillende andere methoden gebruikt kunnen worden om het sensibiliserend vermogen van een stof aan te tonen, wordt de Maximalisatietest beschouwd als de adjuvanstechniek, die de voorkeur heeft.

Voor veel soorten chemicaliën worden niet adjuvanstesten (de Buehlertest heeft de voorkeur) als minder gevoelig beschouwd.

In bepaalde gevallen kunnen er goede redenen zijn om de Buehlertest te verkiezen, met lokale applicatie in plaats van intradermale injectie zoals in de Maximalisatietest met cavia's. Voor het gebruik van de Buehlertest dient een wetenschappelijke verantwoording te worden gegeven.

De Maximalisatietest met cavia's en de Buehlertest worden beschreven in de onderhavige methode. Andere methoden mogen gebruikt worden op voorwaarde dat zij goed zijn gevalideerd en wetenschappelijk verantwoord zijn.

Ongeacht de gebruikte methoden moet de gevoeligheid van de voor de huidsensibilisatietest gebruikte caviastam met regelmatige tussenpozen (zes maanden) worden gecontroleerd met behulp van een bekende, licht tot matig sensibiliserende stof, en hierbij dient een voldoende aantal positieve resultaten te worden verkregen.

Zie tevens algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

De volgende stoffen, zonodig verdund, worden aanbevolen, alsmede iedere andere sensibiliserende stof, die ofwel uit de literatuur bekend is, ofwel tot de groep van de te onderzoeken stof behoort.

— p-fenyleendiamine	CAS nr. 106-50-3
— 1-chloor-2,4-dinitrobenzeen	CAS nr. 97-00-7
— kaliumdichromaat	CAS nr. 7778-50-9
— neomycinesulfaat	CAS nr. 1405-10 3
— nikkelsulfaat	CAS nr. 7786-81-4

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Na de eerste blootstelling aan een teststof (de "inductieperiode") ondergaan de dieren ongeveer twee weken na de laatste inductie een « challenge blootstelling » aan de teststof om vast te stellen of een overgevoeligheid is geïnduceerd. De overgevoeligheid wordt bepaald door het onderzoeken van de reactie van de huid op de challenge blootstelling.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Maximalisatietest met cavia's****1.6.1.1. Voorbereidingen**

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge albino cavia's op willekeurige wijze bij de test en de controlegroepen ingedeeld. Voor de dosering wordt de schouder door knippen en/of scheren onthaard. Hierbij moet erop worden gelet dat de huid niet wordt beschadigd.

1.6.1.2. Proefomstandigheden**1.6.1.2.1. Proefdieren**

De proef dient te worden uitgevoerd met stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt, waarbij de dieren niet meer dan 500 g mogen wegen.

1.6.1.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn. Minimaal tien dieren worden gebruikt voor de behandelde groep en ten minste vijf voor de controlegroep. Het gebruik van een kleiner aantal dieren moet worden gerechtvaardigd. In geval van onduidelijke resultaten kan histopathologisch onderzoek helpen om te beslissen of de test herhaald dient te worden met een andere groep dieren. Als het niet mogelijk is tot de definitieve conclusie te komen dat een teststof wel of niet huidsensibiliserend is, is het aanbevolen, meerdere dieren bij te voegen, om er in totaal ten minste 20 test- en 10 controledieren te hebben.

1.6.1.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof wordt aangepast tot op een niveau dat enige huidirritatie geeft, maar in ieder stadium van inductie goed door de proefdieren wordt verdragen.

De provocatieconcentratie moet gelijk zijn aan de hoogste concentratie die bij niet-gesensibiliseerde dieren niet zal leiden tot huidirritatie.

Deze concentraties kunnen worden vastgesteld door een verkennende proef uit te voeren op kleine schaal (twee of drie dieren).

1.6.1.2.4. Observatieperiode

Gedurende de inductieperiode wordt de huid geobserveerd om eventuele irritatie-effecten te ontdekken. Na de challenge-expositie wordt de reactie van de huid 24 en 48 uur na verwijdering van het gaas geregistreerd.

1.6.1.3. Uitvoering

De dieren worden gewogen aan het begin en het einde van de test. Het schoudergebied wordt onthaard. De procedure bestaat uit twee fasen :

1.6.1.3.1. Inductie

Dag 0 — Testgroep

In de schouderstreek worden de volgende intradermale injecties, elk van 0,1 ml, in tweevoud en steeds één aan iedere zijde, gegeven :

Injectie 1 : 0,1 ml Freund's Compleet Adjuvans (FCA) gemengd met water of fysiologische zoutoplossing (1 :1);

Injectie 2 : 0,1 ml teststof, zo nodig in een geschikt medium;

Injectie 3 : 0,1 ml teststof in FCA.

In injectie 3 worden de in water oplosbare te onderzoeken stoffen opgelost in 0,05 ml water en 0,05 ml onverdund FCA. Indien in vet oplosbare of onoplosbare stoffen dienen te worden onderzocht, moeten deze worden vermengd met onverdund FCA.

In injectie 3 dient de eindconcentratie van de teststof gelijk te zijn aan deze van injectie 2.

De injecties 1 en 2 worden dicht bij elkaar en het dichtst bij het hoofd gegeven en 3 aan de staartzijde van het testgebied.

Dag 0 — Controlegroep

Er worden steeds twee intradermale injecties gegeven op dezelfde plaatsen als hierboven beschreven.

Injectie 1 : 0,1 ml Freund's Compleet Adjuvans (FCA) gemengd met water of fysiologische zoutoplossing (1 :1);

Injectie 2 : 0,1 ml medium;

Injectie 3 : 0,1 ml medium in FCA.

Dag 6 — Test- en controlegroepen

Indien de te onderzoeken stof geen huidirritatie geeft, wordt het testgebied, na het knippen en/of scheren, ingesmeerd met 0,5 ml 10 % natriumlaurylsulfaat in vaseline, om aldus een lokale irritatie te veroorzaken.

Dag 7 — Testgroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. De teststof wordt in een geschikt medium (de keuze van het medium dient te worden verantwoord; vaste stoffen worden fijngemaakt en in een geschikt vehiculum opgenomen; vloeistoffen kunnen eventueel direct worden aangebracht) over een filtreerpapier verspreid (2 x 4 cm) en op het testgebied aangebracht waarmee het, met behulp van een occlusief verband, 48 uur in contact moet blijven.

Dag 7 — Controlegroep

Het testgebied wordt opnieuw onthaard. Slechts het medium alleen wordt op soortgelijke wijze op het testgebied aangebracht waarmee het met een dekkend verband 48 uur in contact moet blijven.

1.6.1.3.2. Challenge

Dag 21

Beide flanken van de dieren in de test en in de controlegroep worden onthaard. Op één flank van de behandelde dieren wordt een gaasje of een cupje met de teststof aangebracht en op de andere flank een gaasje of een cupje met alleen het medium.

Door middel van een dekkend verband wordt ervoor gezorgd dat de pleister 24 uur met de huid in contact blijft.

De controlegroep wordt op identieke wijze blootgesteld.

Dag 23 en 24

— 21 uur na het verwijderen van de pleister wordt het gebied waar de provocatie plaatsvond, schoongemaakt en zonodig onthaard;

— 3 uur later (48 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd;

— 24 uur later (72 uur na het begin) wordt de huid voor de tweede maal geobserveerd en worden de resultaten geregistreerd.

Om de tijdens de eerste provocatie verkregen resultaten te bevestigen kan overwogen worden om ongeveer een week later een tweede provocatie, zo nodig met een nieuwe controlegroep voor het medium, uit te voeren.

1.6.1.3.3. Observatie en scoring

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen als gevolg van de inductie en provocatiebehandelingen moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

Technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen gebruikt worden ter opheldering van onduidelijke reacties of resultaten die door het verkleuren van de huid door de teststof worden gemaskeerd.

1.6.2. Buehlertest

1.6.2.1. Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden gezonde, jonge albino cavia's op willekeurige wijze bij de test en de controlegroepen ingedeeld. Voor de toediening wordt één flank door knippen en/of scheren onthaard. Hierbij moet erop worden gelet dat de huid niet wordt beschadigd.

1.6.2.2. Proefomstandigheden

1.6.2.2.1. Proefdieren

De proef dient te worden uitgevoerd met stammen albino cavia's die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt, waarbij de dieren niet meer dan 500 g mogen wegen.

1.6.2.2.2. Aantal en geslacht

Er kan gebruik worden gemaakt van mannelijke en/of vrouwelijke dieren. Vrouwelijke dieren moeten nullipaar zijn en mogen niet zwanger zijn. Ten minste twintig dieren worden gebruikt voor de testgroep en ten minste tien voor de controlegroep. Het gebruik van een kleiner aantal dieren moet worden gerechtvaardigd. In geval van onduidelijke resultaten kan histopathologisch onderzoek helpen om te beslissen of de test herhaald dient te worden met een andere groep dieren.

1.6.2.2.3. Dosisniveaus

De concentratie van de teststof wordt aangepast aan het hoogste niveau dat in iedere fase van de inductie goed systemisch kan worden verdragen en dat, bij irriterende stoffen, een milde tot matige irritatie veroorzaakt bij de meerderheid van de proefdieren. De provocatieconcentratie moet gelijk zijn aan de hoogste concentratie die bij niet-gesensibiliseerde dieren niet zal leiden tot huidirritatie. Deze concentraties kunnen worden vastgesteld door een verkennende proef uit te voeren op kleine schaal (twee of drie dieren).

1.6.2.2.4. Observatieperiode

Gedurende de inductieperiode wordt de huid geobserveerd om eventuele irritatie-effecten te ontdekken. Na de provocatie-expositie wordt de reactie van de huid 24 en 48 uur na verwijdering van de pleister geregistreerd, d.w.z. 30 en 54 uur na het begin van de blootstelling.

1.6.2.3. Uitvoering

De dieren worden gewogen aan het begin en het einde van de test.

De procedure bestaat uit twee fasen :

1.6.2.3.1. Inductie

Dag 0 — Testgroep

Eén flank wordt onthaard. 0,5 ml van de te onderzoeken stof wordt in een geschikt medium (de keuze van het medium dient te worden verantwoord; vloeistoffen kunnen eventueel direct worden aangebracht) over een katoenen gaasje verspreid. Het gaasje wordt op het testgebied aangebracht waarmee het, met behulp van een occlusieve pleister of een cupje met een geschikt verband, 6 uur in contact moet blijven.

Dag 0 — Controlegroep

Eén flank wordt onthaard. Alleen het medium wordt op soortgelijke wijze op het testgebied aangebracht. Het wordt met een occlusieve pleister of een cupje en een geschikt verband gedurende 6 uur in contact gehouden met de huid.

Dag 7 en 14

Dezelfde blootstelling als op Dag 0 wordt op Dag 7 en Dag 14 uitgevoerd op hetzelfde testgebied (zodanig onthaard).

1.6.2.3.2. Provocatie

Dag 28

De andere flank van de dieren in de behandelde en in de controlegroep worden onthaard. Een occlusieve pleister of een cupje met 0,5 ml teststof wordt aangebracht, met de maximale niet-irriterende concentratie, op het achterste deel van de flank van de behandelde dieren. Een occlusieve pleister of cupje met enkel het medium wordt op het voorste deel van de flank aangebracht.

De occlusieve pleisters of cupjes worden gedurende 6 uur met behulp van een geschikt verband met de huid in contact gehouden.

De controlegroep wordt op identieke wijze blootgesteld.

Dag 29 en 30

— 21 uur na het verwijderen van de pleister wordt het gebied waar de provocatie plaatsvond, schoongemaakt en zodanig onthaard;

— 3 uur later (30 uur na het begin van de provocatie) wordt de reactie van de huid geobserveerd en geregistreerd;

— 24 uur later (54 uur na het begin) wordt de huid voor de tweede maal geobserveerd en worden de resultaten geregistreerd.

1.6.2.3.3. Observatie en scoring

Alle reacties van de huid en alle ongewone bevindingen als gevolg van de inductie en provocatie moeten worden geregistreerd en gerapporteerd.

Technieken zoals histopathologisch onderzoek of meting van de dikte van de huidplooi kunnen gebruikt worden ter opheldering van onduidelijke reacties of resultaten die door het verkleuren van de huid worden gemaskeerd.

2. GEGEVENS (Maximalisatietest en Buehlertest)

De gegevens moeten, indien mogelijk, in tabelvorm worden samengevat met voor ieder dier de reacties van de huid bij iedere waarneming.

3. RAPPORTAGE (Maximalisatietest en Buehlertest)

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN (MAXIMALISATIETEST EN BUEHLERTEST)

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

— gebruikte caviastam;

— proefomstandigheden, de voor de inductie en provocatie gebruikte medium en concentraties van de te onderzoeken stof;

— aantal, leeftijd en geslacht van de dieren;

— gewicht van ieder dier afzonderlijk bij het begin en aan het eind van het onderzoek;

— iedere waarneming op ieder dier afzonderlijk, en indien hiervan gebruik is gemaakt, ook het score-systeem;

— bespreking van de resultaten;

— interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE (MAXIMALISATIETEST EN BUEHLERTEST)

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.7. TOXICITEIT (ORAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks oraal toegediend aan verscheidene groepen proefdieren, in geleidelijk stijgende doses. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van het onderzoek leven, wordt necropsie verricht.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als gedurende de proef. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor de start van de behandeling in groepen ingedeeld. De teststof kan met de voeding, via een maagsonde, in capsules of met het drinkwater worden toegediend. De teststof moet bij alle dieren gedurende de volledige proefperiode op dezelfde manier worden toegediend. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de toediening te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Tenzij er contra-indicaties bestaan, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van rattenstammen die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt. In het ideale geval moet met de dosering worden begonnen voor de ratten 6 weken oud zijn. Zij mogen in ieder geval niet ouder zijn dan 8 weken.

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt, niet meer dan $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) per groep moeten worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal dieren worden verhoogd met het aantal dat tussentijds zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf dieren per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau en vervolgens gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of toxische effecten verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

1.6.2.3. 3. Dosisniveaus

Ten minste drie dosisniveaus en een controle zijn vereist. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren van de testgroepen worden behandeld. Indien een medium wordt gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet het medium aan de dieren van de controlegroep op dezelfde wijze worden toegediend als aan die van de testgroepen en moet de dosis die van het medium wordt toegediend even groot zijn als de dosis die de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau ontvangen. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau dit overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste dosis, in de tussengroepen en in de controlegroep mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien de teststof met de voeding wordt toegediend, kan een constante voedingsconcentratie (ppm of mg/kg) of een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van de dieren worden gebruikt; de gekozen methode moet worden gespecificeerd. Indien de stof via een maagsonde wordt toegediend, moeten de doses op vaste tijdstippen worden gegeven. De doses moeten geregeld worden aangepast (wekelijks of twee keer per week) om een constant dosisniveau als functie van het lichaamsgewicht van het dier te verkrijgen.

1.6.2.4. Limiettest

Indien bij een onderzoek van 28 dagen, verricht volgens onderstaande methode bij een dosisniveau van 1000 mg/kg lichaamsgewicht/dag, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, geen toxische effecten optreden, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te ondernemen. Wanneer stoffen met lage toxiciteit met de voeding worden toegediend moet erop worden toegezien dat de hoeveelheden en andere eigenschappen van de teststof niet interfereren met de normale voedingsbehoeften.

1.6.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden geobserveerd. Tekenen van toxiciteit moeten met het tijdstip waarop deze voor het eerst zijn opgetreden en de mate en duur ervan worden genoteerd. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop de intoxicatieverschijnselen zich voor het eerst voordoen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten eveneens worden genoteerd.

1.6.3. Uitvoering

De dieren krijgen in het ideale geval gedurende een periode van 28 dagen, 7 dagen per week, een dosis van de teststof toegediend. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen.

Bij het observeren moet aandacht worden besteed aan veranderingen van huid en vacht, ogen en slijmvliezen, ademhaling, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moet het voerbruik (en het waterverbruik indien de teststof met het drinkwater wordt toegediend) worden gemeten en moeten de dieren worden gewogen.

De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van bijvoorbeeld kannibalisme of autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de behandelingsperiode wordt bij alle overlevende dieren van de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroepen) necropsie verricht. Wanneer stervende dieren of dieren met hevige angst of pijn worden aangetroffen, moeten deze worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Aan het einde van de behandelingsperiode moeten bij alle dieren met inbegrip van die uit de controlegroepen de volgende onderzoeken worden verricht :

1) hematologie, waarbij ten minste bepaling van het hematocriet en het hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale- en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van een maat voor het stollingsvermogen;

2) klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de leverfunctie en nierfunctie : serum alanineaminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met : calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine, en cholinesterase-activiteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van waargenomen effecten uit te breiden.

1.6.3.1. *Macroscopische necropsie*

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijniere en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (lever, nieren, milt, testes, bijniere, hart en alle organen die macroscopisch waarneembaar letsel of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

1.6.3.2. *Histopathologisch onderzoek*

Bij de dieren in de groep behandeld met het hoogste dosisniveau en bij de dieren in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek worden verricht op de bewaarde organen en weefsels. Organen en weefsels die blijken te zijn beschadigd door de teststof op het hoogste dosisniveau, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroepen moet speciaal worden gelet op die organen en weefsels waarin effecten blijken te zijn opgetreden bij de andere behandelde groepen.

2. GEGEVENS

De gegevens moeten worden samengevat in tabellen die voor iedere proefgroep laten zien : het aantal dieren aan het begin van het onderzoek en het aantal dieren dat ieder type beschadiging vertoont.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode mag hiervoor worden gebruikt.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN HET ONDERZOEK

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;
- proefomstandigheden;
- dosisniveaus (met het eventuele medium) en concentraties;
- gegevens over de toxische reacties naar geslacht en dosis;
- waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- tijdstip gedurende studie waarop dieren tussentijds sterven of aangeven of dieren tot het eind van de proef in leven bleven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische onderzoeken en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische onderzoeken en alle resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar van toepassing statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.8. TOXICITEIT (INHALATIE) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Het is nuttig om over oriënterende informatie te beschikken ten aanzien van de deeltjesgrootteverdeling, de dampspanning, het smeltpunt, het kookpunt, het vlampunt en het ontploffingsgevaar (indien van toepassing) van de te onderzoeken stof.

Zie verder algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Verscheidene groepen proefdieren worden gedurende een periode van 28 dagen dagelijks een bepaalde tijd aan geleidelijk stijgende concentraties van de teststof blootgesteld. Er wordt een concentratie per groep gebruikt. Indien een medium wordt gebruikt om de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken, moet een mediumcontrolegroep worden toegevoegd. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proefnemingen leven, wordt necropsie verricht.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Voorbereidingen**

Vóór het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als gedurende de proef. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor het onderzoek in het vereiste aantal groepen ingedeeld. Waar nodig wordt een passend medium aan de teststof toegevoegd ten einde de juiste concentratie van de teststof in de atmosfeer te bereiken. Indien een medium of andere additieven worden gebruikt om de dosering te vergemakkelijken, moet bekend zijn dat deze geen toxische effecten veroorzaken. In voorkomend geval kunnen bestaande gegevens worden gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden**1.6.2.1. Proefdieren**

Tenzij er contra-indicaties zijn, wordt de voorkeur gegeven aan ratten. Er dient gebruik te worden gemaakt van jonge gezonde dieren van rattenstammen die gewoonlijk in laboratoria worden gebruikt.

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan $\pm 20\%$ van het betreffende gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor iedere testgroep moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoogste concentratieniveau, waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

1.6.2.3. Blootstellingsconcentraties

Ten minste drie concentraties met een controle of een mediumcontrole (overeenkomend met de concentratie van het medium bij het hoogste expositieniveau), indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de testgroepen worden behandeld. De hoogste concentratie moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij de laagste concentratie mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet de laagste concentratie deze overschrijden. In het ideale geval treden bij de middelste concentratie minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussenconcentratie moet het verschil tussen de concentraties zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste concentratie, in de tussengroepen en in de controlegroepen mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

1.6.2.4. Blootstellingstijd

De dagelijkse blootstellingstijd bedraagt 6 uur, maar een afwijkende duur kan in verband met specifieke vereisten nodig zijn.

1.6.2.5. Apparatuur

De dieren worden aan de teststoffen blootgesteld met behulp van inhalatieapparatuur die zodanig is gebouwd dat kan worden gezorgd voor een dynamische luchtdoorstroming van ten minste 12 luchtverversingen per uur, een toereikend zuurstofgehalte en een gelijkmatige verdeling van de teststof in de atmosfeer. Als van een expositiekamer gebruik wordt gemaakt, moet deze op zodanige wijze zijn ontworpen dat de dieren zo min mogelijk bij elkaar kunnen kruipen en zoveel mogelijk door inhalatie aan de teststof worden blootgesteld. Als algemene regel voor het verzekeren van een stabiele atmosfeer in de expositiekamer geldt dat het totale "volume" van de proefdieren niet méér mag bedragen dan 5 % van het volume van de blootstellingskamer. Naar keuze kunnen de dieren oronasaal, alleen met hun

kop of individueel met hun hele lijf aan de testlucht worden blootgesteld; de eerste twee methoden zullen ertoe bijdragen dat zo min mogelijk teststof via andere wegen in het lichaam wordt opgenomen.

1.6.2.6. Observatieperiode

De proefdieren moeten tijdens de gehele periode van behandeling en herstel dagelijks op tekenen van toxiciteit worden onderzocht. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxische verschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden genoteerd.

1.6.3. Uitvoering

De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, 5 tot 7 dagen per week aan de teststof blootgesteld. Dieren in satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. Tijdens de proefnemingen dient de temperatuur op $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ te worden gehouden.

In het ideale geval moet de relatieve vochtigheid tussen 30 % en 70 % worden gehouden, behalve waar dit niet goed uitvoerbaar is (bijvoorbeeld bij het testen van sommige aerosolen). Het onderhouden van een lichte onderdruk ($\leq 5\text{ mm}$ water) voorkomt het weglekken van de teststof naar de omgeving. Gedurende de blootstelling worden de dieren voedsel en water onthouden.

Er moet gebruik worden gemaakt van een dynamisch inhalatiesysteem met een geschikt systeem voor de analytische controle van de concentratie. Aanbevolen wordt in een verkennende proef vast te stellen welke blootstellingsconcentraties voor de proeven het meest geschikt zijn. De doorstromingssnelheid moet zodanig worden aangepast dat de condities in de expositiekamer homogeen zijn. Het systeem moet waarborgen dat de omstandigheden bij de proef zo spoedig mogelijk stabiel zijn.

De volgende parameters moeten worden gemeten of gemonitord :

a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) (continu);

b) de feitelijke concentratie van de teststof in het ademhalingsgebied. Tijdens de dagelijkse blootstelling mag de concentratie niet méér dan $\pm 15\%$ van het gemiddelde afwijken. Bij sommige aerosolen is het mogelijk dat de concentratie niet binnen deze grenzen gehouden kan worden; in dat geval kan een grotere afwijking worden aanvaard. Tijdens de gehele duur van de studie moeten de dagelijkse concentraties zo constant mogelijk worden gehouden. Voor aerosolen moet ten minste éénmaal per week bij elke testgroep de deeltjesgrootteverdeling worden geanalyseerd;

c) de temperatuur en de vochtigheid (continu, indien mogelijk);

Tijdens en na de blootstelling worden waarnemingen gedaan die voor elk individueel dier systematisch worden geregistreerd. Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met het tijdstip waarop deze voor het eerst optreden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren wordt in ieder geval aandacht besteed aan veranderingen van huid en vacht, ogen, slijmvliezen, ademhalingsorganen, bloedsomloop, autonoom en centraal zenuwstelsel, somatomotorische activiteit en gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het wordt eveneens aanbevolen het voerconsumptie wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd, om te voorkomen dat ze voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep) necropsie verricht. Stervende dieren of dieren met hevige angst of pijn, moeten meteen na ontdekking worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de proeven moet bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroep, het volgende worden onderzocht :

i) hematologie, waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytencelling, totale en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingseigenschappen moeten worden uitgevoerd.

ii) klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de leverfunctie en nierfunctie wordt bekeken : serum alanineaminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met : calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte in nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

1.6.3.1. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijnieren, longen en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (de ademhalingswegen, lever, nieren, milt, testes, bijnieren, hart en alle organen die macroscopisch waarneembare afwijkingen of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel histopathologisch onderzoek. De longen moeten in hun geheel worden verwijderd, gewogen en behandeld worden met een geschikt fixatief om ervoor te zorgen dat de longstructuur intact blijft.

1.6.3.2. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de hoge concentratiegroep en bij de dieren in de controlegroep(en) moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste concentratieniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van dieren in satellietgroepen moet speciaal worden gelet op organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat : het aantal dieren bij het begin van het onderzoek en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd.

Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

—diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, voeding, enzovoort;

— proefomstandigheden :

Beschrijving van de blootstellingsapparatuur met inbegrip van ontwerp, type, afmetingen, luchtbron, systeem voor het genereren van aerosolen, methode van luchtconditionering, behandeling van de afgevoerde lucht en de wijze waarop de dieren tijdens de proeven in een blootstellingskamer zijn ondergebracht als deze is gebruikt. Er moet een

beschrijving worden gegeven van de apparatuur voor het meten van de temperatuur, de vochtigheid en, in voorkomend geval, de stabiliteit van de concentratie of de deeltjesgrootteverdeling van de aerosolen.

Gegevens betreffende de blootstelling :

Deze moeten tabellarisch worden gerangschikt en worden voorzien van gemiddelde waarden en een maat voor de variabiliteit (bijvoorbeeld standaardafwijking). Zij dienen zo mogelijk te omvatten :

- a) de luchtdoorstromingssnelheid (luchtdebiet) door de inhalatieapparatuur;
- b) temperatuur en vochtigheid van de lucht;
- c) nominale concentraties (de totale hoeveelheid teststof die de inhalatieapparatuur wordt binnengeleid, gedeeld door het luchtvolume);
- d) aard van het eventuele medium;
- e) feitelijke concentraties van de teststof in het ademhalingsgebied van de dieren;
- f) massa-mediaan van de aërodynamische diameter (MMAD) en de geometrische standaardafwijking (GSD);
 - gegevens over de toxische reactie per geslacht en concentratie;
 - tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt, of aangeven of de dieren tot het einde van de proef in leven bleven;
 - beschrijving van toxische of andere effecten;
 - hoogste niveau waarbij geen effect wordt waargenomen;
 - tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel wordt waargenomen en het verloop hiervan;
 - gegevens over voedselconsumptie en lichaamsgewicht;
 - uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten; uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;
 - bevindingen bij de necropsie; een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
 - waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
 - bespreking van de resultaten; interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.9. TOXICITEIT (DERMAAL) BIJ HERHAALDE TOEDIENING (28 DAGEN)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt B).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De teststof wordt gedurende een periode van 28 dagen dagelijks in geleidelijk stijgende doseringen op de huid van verscheidene groepen proefdieren aangebracht. Er wordt één dosis per groep gebruikt. Gedurende de periode dat de stof wordt toegediend, worden de dieren dagelijks geobserveerd om tekenen van toxiciteit te ontdekken. Bij dieren die tijdens het onderzoek sterven en bij dieren die aan het eind van de proef leven, wordt necropsie verricht.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

Voor het onderzoek worden de dieren ten minste 5 dagen onder gelijke huisvestings- en voedingsomstandigheden gehouden als tijdens de proef voorkomen. Gezonde jonge dieren worden op willekeurige wijze voor de behandeling ingedeeld bij testgroepen en controlegroepen. Kort voor de proef wordt het haar op het ruggedeelte van de romp van de proefdieren geknipt; het haar kan ook worden geschoren, maar dit moet dan ongeveer 24 uur voor de proef worden gedaan. Gewoonlijk zal het dier ongeveer om de week opnieuw moeten worden geknipt of geschoren. Bij het knippen of scheren moet erop worden gelet dat de huid niet wordt bekrast. Ten minste 10 % van de lichaamsoppervlakte moet voor het aanbrengen van de teststof worden onthaard. Bij het bepalen van de oppervlakte die moet worden onthaard en de afmetingen van de aan te brengen bedekking moet rekening worden gehouden met het gewicht van het dier. Bij een proef met vaste stoffen, die eventueel tot poeder kunnen worden fijngemaakt, moet de teststof voldoende met water of, zo nodig, met een passend medium worden bevochtigd, zodat de stof goed in contact met de huid komt. Vloeibare teststoffen worden in het algemeen onverdund gebruikt. De teststof wordt gedurende 5 tot 7 dagen per week dagelijks aangebracht.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Er kan gebruik worden gemaakt van volwassen ratten, konijnen of cavia's. Ook andere diersoorten kunnen worden gebruikt, maar de noodzaak hiervoor moet worden aangetoond.

Bij het begin van de studie mag het gewicht van de dieren die bij de test worden gebruikt niet meer dan $\pm 20\%$ van het gemiddelde gewicht afwijken.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor ieder dosisniveau moeten ten minste tien dieren (vijf wijfjes en vijf mannetjes) met een gezonde huid worden gebruikt. De wijfjes moeten nullipaar zijn en niet zwanger. Indien het de bedoeling is tussentijds dieren te doden, moet het aantal worden verhoogd met het aantal dieren dat volgens plan voor de voltooiing van de studie zal worden gedood. Daarnaast kan een satellietgroep van tien dieren (vijf per geslacht) gedurende 28 dagen worden behandeld met het hoge dosisniveau waarna zij nog gedurende 14 dagen na de behandeling worden geobserveerd om na te gaan of de toxische effecten eventueel verdwijnen, voortduren of pas later tot uiting komen. Tevens wordt een satellietgroep van tien controledieren (vijf per geslacht) gebruikt.

1.6.2.3. Dosisniveau

Ten minste drie dosisniveaus, met een controlegroep of een mediumcontrolegroep, indien een medium wordt gebruikt, zijn vereist. De expositieduur moet ten minste 6 uur per dag bedragen. De teststof moet iedere dag op ongeveer dezelfde tijd worden aangebracht; op vastgestelde tijden (iedere week of twee keer per week) is een correctie vereist om ervoor te zorgen dat het dosisniveau in verhouding tot het lichaamsgewicht van het dier constant blijft. Afgezien van de toediening van de teststof moeten de dieren in de controlegroep op dezelfde wijze als de dieren in de proefgroep worden behandeld. Indien een medium is gebruikt om het doseren te vergemakkelijken moet aan de mediumcontrolegroep op dezelfde wijze als aan de testgroep een dosis van het medium worden toegediend en deze dosis moet even groot zijn als die van de dieren in de groep met het hoogste dosisniveau. Het hoogste dosisniveau van de teststof moet leiden tot toxische effecten, maar er mogen geen of weinig sterfgevallen voorkomen. Bij het laagste dosisniveau mogen geen tekenen van toxiciteit optreden. Indien het blootstellingsniveau van de mens kan worden geschat, moet het laagste niveau deze overschrijden. In het ideale geval treden bij het middelste dosisniveau minimaal waarneembare toxische effecten op. Bij meer dan één tussendosis moet het verschil tussen de dosisniveaus zo groot zijn dat een gradatie in toxische effecten wordt verkregen. In de groep met de laagste dosis en in de tussengroepen, alsmede in de controlegroepen, mogen niet veel sterfgevallen voorkomen, omdat anders een zinvolle evaluatie van de resultaten niet mogelijk is.

Indien toediening van de teststof tot ernstige huidirritatie leidt, moeten de concentraties worden verlaagd, wat vermindering of ontbreken van andere toxische effecten bij het hoge dosisniveau tot gevolg kan hebben. Indien de huid ernstig is beschadigd, kan het zelfs noodzakelijk zijn de studie te beëindigen en een nieuwe studie met lagere concentraties te beginnen.

1.6.2.4. Limiettest

Indien bij een verkennende proef geen toxische effecten optreden bij een dosisniveau van 1000 mg/kg, of een hoger niveau dat verband houdt met het niveau waaraan de mens, voor zover bekend, kan worden blootgesteld, is het wellicht niet noodzakelijk om verdere proeven te nemen.

1.6.2.5. Observatieperiode

De proefdieren moeten dagelijks worden onderzocht op tekenen van toxiciteit. Het tijdstip waarop de dood intreedt, het tijdstip waarop toxiciteitsverschijnselen voor het eerst zijn waargenomen en het tijdstip waarop zij weer verdwijnen, moeten worden opgetekend.

1.6.3. Uitvoering

De dieren moeten afzonderlijk in kooien worden gehuisvest. De dieren worden gedurende een periode van 28 dagen, zo mogelijk 7 dagen per week, met de teststof behandeld. Dieren in eventuele satellietgroepen voor latere waarnemingen moeten nog 14 dagen zonder behandeling worden gehouden om herstel of voortduren van de toxische effecten te kunnen vaststellen. De blootstellingstijd moet 6 uur per dag bedragen.

De teststof moet gelijkmatig worden aangebracht over een oppervlakte van ongeveer 10 % van de totale lichaamsoppervlakte. Bij zeer toxische stoffen kan de te bedekken oppervlakte kleiner zijn, maar een zo groot mogelijke oppervlakte moet worden bedekt met een zo dun en gelijkmatig mogelijk aangebrachte laag.

De teststof moet gedurende de blootstellingstijd door middel van poreus gaasverband en niet-irriterend plakband in contact met de huid worden gehouden. Het testgedeelte van de huid moet op geschikte wijze verder worden bedekt om het verbandgaas en de teststof op hun plaats te houden en om te verhinderen dat de dieren de teststof via de mond opnemen. Hulpmiddelen om de dieren te fixeren kunnen worden gebruikt om te voorkomen dat de dieren de teststof via de mond opnemen, maar het wordt niet aangeraden de dieren volledig te immobiliseren. Als alternatief kan een "beschermende halskraag" worden gebruikt.

Aan het einde van de blootstellingsperiode wordt de resterende teststof zo mogelijk met water van de huid verwijderd of anders door middel van een andere geschikte reinigingstechniek.

Alle dieren moeten dagelijks worden geobserveerd; tekenen van toxiciteit moeten worden genoteerd met inbegrip van het tijdstip waarop deze voor het eerst optraden en de mate en de duur ervan. Bij het observeren moet aandacht worden besteed aan veranderingen van de huid, de vacht, de ogen en de slijmvliezen, de ademhalingsorganen, de bloedsomloop, het autonome en het centrale zenuwstelsel, de somatomotorische activiteit en het gedrag. Wekelijks moeten de dieren worden gewogen. Het is eveneens aanbevolen het voerverbruik wekelijks te meten. De dieren moeten regelmatig worden geobserveerd om te voorkomen dat zij voor de studie verloren gaan als gevolg van oorzaken als kannibalisme, autolyse van weefsels of omdat de dieren in verkeerde kooien zijn geplaatst. Na afloop van de onderzoeksperiode wordt bij alle overlevende dieren in de behandelde groepen (afgezien van de dieren in de satellietgroep), necropsie verricht. Indien stervende dieren of dieren met hevige nood/ongemak of pijn worden aangetroffen, moeten deze worden verwijderd en op een humane manier worden gedood; bij hen wordt eveneens necropsie verricht.

Na afloop van de studie moeten bij alle dieren, met inbegrip van die uit de controlegroepen, de volgende onderzoeken worden uitgevoerd :

1) Hematologie waarbij ten minste bepaling van hematocriet en hemoglobinegehalte, erythrocytentelling, totale en gedifferentieerde telling van de leucocyten en meting van stollingsvermogen.

2) Klinisch-biochemische bepalingen in het bloed waarbij ten minste één parameter van de lever- en nierfunctie : serum alanineaminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur-pyrodruivenzuur-transaminase (SGPT)), serum aspartaataminotransferase (vroegere benaming : serum glutaminezuur-oxaalazijnzuur-transaminase (SGOT)), ureum, albumine, bloedcreatinine, totaal bilirubine en totaal serumewit.

Voor een goede toxicologische evaluatie kan het nodig zijn het onderzoek uit te breiden met : calcium, fosfor, chloride, natrium, kalium, glucosegehalte bij nuchtere toestand, analyse van de lipiden, hormonen, zuur/base-evenwicht, methemoglobine en cholinesterase-activiteit.

Zo nodig kan verder klinisch-biochemisch onderzoek worden verricht om het onderzoek van de waargenomen effecten uit te breiden.

1.6.4. Macroscopische necropsie

Bij alle dieren in de studie moet een volledige macroscopische necropsie worden uitgevoerd. Zo spoedig mogelijk na sectie moeten ten minste lever, nieren, bijnieren en testes nat worden gewogen om te voorkomen dat ze uitdrogen. Organen en weefsels (de normale en de behandelde huid, lever, nieren, milt, testes, bijnieren, hart en alle organen die macroscopisch waarneembare beschadigingen of veranderingen in omvang vertonen) moeten in een geschikt medium worden bewaard voor eventueel later histopathologisch onderzoek.

1.6.5. Histopathologisch onderzoek

Bij de dieren in de groep die een hoge dosis heeft ontvangen en bij die in de controlegroep moet histopathologisch onderzoek op de bewaarde organen en weefsels worden verricht. Organen en weefsels die bij het hoogste doseringsniveau door de teststof blijken te zijn beschadigd, moeten in alle groepen met een lagere dosering worden onderzocht. Bij het histopathologisch onderzoek van de dieren in de satellietgroep moet speciaal worden gelet op de organen en weefsels waar, bij de andere behandelde groepen, effecten blijken te zijn opgetreden.

2. GEGEVENS

De volgende gegevens moeten voor iedere proefgroep in tabellen worden samengevat : het aantal dieren bij het begin van het onderzoek en het aantal dieren waarbij ieder type beschadiging voorkomt.

Alle waargenomen resultaten moeten met behulp van een geschikte statistische methode worden geëvalueerd. Iedere erkende statistische methode kan hiervoor worden gebruikt.

3. RAPPORTAGE**3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- diersoort, stam, herkomst, leefomstandigheden, dieet, enzovoort;
- proefomstandigheden (met inbegrip van het soort verband : occlusief of niet-occlusief);
- dosisniveaus (met het eventueel medium) en concentraties;
- waar mogelijk het hoogste dosisniveau waarbij geen effect optreedt;
- gegevens over de toxische reactie naar geslacht en dosis;
- tijdstip gedurende de studie waarop de dood intreedt, of aangeven of dieren tot het eind van de proef bleven leven;
- toxische of andere effecten;
- tijdstip waarop een abnormaal verschijnsel werd waargenomen en het verloop hiervan;
- gegevens over voedsel en lichaamsgewicht;
- uitgevoerde hematologische proeven en alle resultaten;
- uitgevoerde klinisch-biochemische proeven en alle resultaten;
- bevindingen bij de necropsie;
- een gedetailleerde beschrijving van alle histopathologische bevindingen;
- waar mogelijk statistische behandeling van de resultaten;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.10. MUTAGENITEIT ("IN VITRO" CYTOGENETISCHE TEST OP ZOOGDIEREN)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Deze cytogenetische test (in vitro) is een kortdurende mutageniteitstest voor de opsporing van structurele chromosoomafwijkingen in gekweekte zoogdiercellen. Culturen van zowel bestaande cellijnen als van primaire celculturen kunnen worden gebruikt. Na blootstelling aan de teststoffen met en zonder een geschikt metabool activeringssysteem worden celculturen behandeld met spindle-remmers, zoals colchicine, om cellen te accumuleren in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase). Op vastgestelde tijden worden de cellen geoogst en worden chromosoompreparaten gemaakt. De preparaten worden gekleurd en de metafasecellen worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE**1.6.1. Voorbereidingen****1.6.1.1. Cellen**

Bestaande cellijnen of culturen van primaire cellen worden gebruikt, zoals Chinese-hamstercellen en menselijke lymfocyten. De teststoffen worden in een kweekmedium of in andere geschikte oplosmiddelen opgelost alvorens de cellen worden behandeld.

1.6.1.2. *Metabool activeringssysteem*

De cellen dienen te worden blootgesteld aan de teststof zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem. Het meest algemeen gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie verrijkt met een cofactor, verkregen uit de lever van knaagdieren die behandeld werden met enzym-inducerende stoffen.

1.6.2. **Proefomstandigheden**

Aantal culturen

Voor elk experimenteel punt worden ten minste twee culturen gebruikt.

Gebruik van negatieve en positieve controles

Het oplosmiddel (wanneer het oplosmiddel niet bestaat uit voedingsbodem of water), het leverenzymactiveringsmengsel, het leverenzymactiveringsmengsel met oplosmiddel en onbehandelde controles worden als negatieve controles gebruikt.

Bij elke proef behoort een positieve controle; bij het experiment waarbij een leverenzymactiveringsmengsel wordt gebruikt om de teststoffen te activeren, moet als positieve controle een stof worden gebruikt waarvan bekend is dat deze metabole activering nodig heeft.

Dosisniveau

Te minste drie doses van de teststof, met een spreiding van tenminste een factor 10 in de dosis, worden toegepast. De hoogste dosis moet de mitotische activiteit met circa 50 % remmen of een ander teken van cytotoxiciteit vertonen. Indien de teststof niet toxisch is, dient ze te worden onderzocht tot aan de oplosbaarheidsgrens of tot een maximale concentratie van 5 mg/ml.

Omstandigheden voor de cultuur

De kweekomstandigheden : kweekmedium en incubatieomstandigheden zoals temperatuur, gebruikte kweekvaten, CO₂-concentraties en vochtigheid dienen geschikt te zijn.

1.6.3. **Procedure**

1.6.3.1. *Bereiding van culturen*

Bestaande cellijnen : de cellen worden gekweekt uit voorraadculturen (bijvoorbeeld door trypsinebehandeling of door afschudden), met de juiste dichtheid geënt in kweekvaten en geïncubeerd bij 37 °C.

Menselijke lymfocyten : bloed waaraan heparine is toegevoegd, wordt gebracht in een voedingsbodem die fytohemagglutinine, foetaal kalfsserum en antibiotica bevat en wordt bij 37 °C geïncubeerd.

1.6.3.2. *Behandeling van de culturen met de te testen stof*

i) *Behandeling zonder leverenzymactiveringsmengsel*

Alle behandelingen beslaan zo mogelijk ten minste één volledige celcyclus en de fixatieschema's worden zodanig gekozen dat van cellen die tijdens verschillende stadia van de cyclus zijn behandeld, de eerste mitose na de behandeling wordt geanalyseerd. Wanneer de behandeling niet de gehele lengte van een celcyclus beslaat, worden de fixatietijden zodanig gekozen dat cellen worden bemonsterd die tijdens de behandeling in verschillende stadia van de celcyclus verkeren, dat wil zeggen G₁, S en G₂.

De teststof wordt toegevoegd aan culturen van erkende cellijnen wanneer deze in het exponentiële groeistadium verkeren. Culturen van menselijke lymfocyten worden behandeld terwijl zij nog in een halfsynchrone toestand zijn.

ii) *Behandeling met leverenzymactiveringsmengsel*

Voor de behandeling dient de teststof in combinatie met het activeringssysteem zo lang mogelijk aanwezig te zijn, zonder een toxisch effect op de cellen uit te oefenen. Indien deze behandeling vanwege de toxiciteit niet de gehele duur van een celcyclus beslaat, worden de fixatietijden zodanig gekozen dat cellen worden bemonsterd die tijdens de behandeling in verschillende stadia van de celcyclus verkeren, dat wil zeggen G₁, S en G₂.

Oogsten van cellen

Celculturen worden gedurende een afdoende periode vóór het oogsten behandeld met een spindle-remmer. Elke cultuur wordt afzonderlijk geoogst en verwerkt voor chromosoompreparaten.

Ten minste twee oogsttijden zijn nodig. Het is aan te bevelen om de eerste na ongeveer één celcyclus uit te voeren en de tweede later, om er zeker van te zijn dat alle stadia van de celcyclus meegenomen worden en om rekening te houden met vertraging in de celcyclus.

1.6.3.3. *Chromosoompreparaten*

Voor chromosoompreparaten zijn nodig : hypotonische behandeling van de cellen, fixatie, spreiding op objectglaasjes en kleuring.

Analyse

Per cultuur worden ten minste 100 goed gespreide metafasen geanalyseerd op chromosoomafwijkingen. Voor de analyse worden de objectglaasjes gecodeerd. Bij menselijke lymfocyten worden alleen metafasen met 46 centromeren geanalyseerd.

Bij erkende cellijnen worden alleen metafasen geanalyseerd die het modale aantal ± 2 centromeren bevatten.

Voorts dient voor elk dosisniveau de mitotische index of een andere geschikte indicatie van cytotoxiciteit te worden bepaald.

2. **GEGEVENS**

De gegevens worden in een tabel opgenomen. Chromatideafwijkingen ('gaps', breuken, uitwisselingen), chromosoomafwijkingen (bijvoorbeeld gaps, breuken, minutes, ringen, dicentrische en polycentrische structuren) en het aantal afwijkende metafasen (met en zonder 'gaps') worden voor alle behandelde en controleculturen afzonderlijk vermeld.

De gegevens dienen aan de hand van passende statistische methoden te worden geëvalueerd.

De testresultaten dienen te worden vergeleken met de gelijktijdig uitgevoerde negatieve controles.

Ten minste twee onafhankelijke onderzoeken dienen te worden uitgevoerd. Eén enkel onderzoek kan echter voldoende zijn, indien dit wetenschappelijk verantwoord kan worden. Het is niet noodzakelijk het tweede onderzoek op identieke wijze als het eerste uit te voeren. Het kan zelfs wenselijk zijn om bepaalde testomstandigheden te veranderen om aldus meer bruikbare gegevens te verkrijgen.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- gebruikte cellen;
- proefomstandigheden : samenstelling van het kweekmedium, CO₂-concentratie, incubatietemperatuur, incubatieduur, dosisniveaus, duur van de behandeling, duur van de behandeling met en concentratie van de gebruikte spindle-remmer, het gebruikte soort leverenzymactiveringsmengsel, positieve en negatieve controles;
- aantal celculturen;
- aantal geanalyseerde metafasen (voor elke cultuur worden de gegevens afzonderlijk vermeld);
- mitotische index of een andere indicatie van cytotoxiciteit;
- type en aantal afwijkingen, afzonderlijk vermeld voor elke behandelde en controlecultuur, modaal aantal chromosomen in de gevestigde cellijnen die men heeft gebruikt;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.11. MUTAGENITEIT (IN VIVO CYTOGENETISCHE TEST OP BEENMERG VAN ZOOGDIEREN, CHROMOSOOMANALYSE)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Deze cytogenetische *in vivo* test is een kortdurende mutageniteitsproef voor het vaststellen van structurele chromosoomafwijkingen. Chromosoomafwijkingen worden in het algemeen geëvalueerd in de eerste mitoses na de behandeling. Bij chemische mutagenen zijn de meeste geïnduceerde afwijkingen van het chromatide-type.

Bij deze methode worden beenmergcellen van zoogdieren gebruikt, die op geschikte wijze aan teststoffen worden blootgesteld en met opeenvolgende tussenperiodes worden gedood. Alvorens zij gedood worden, worden de dieren behandeld met een spindle-remmer, zoals colchicine, ten einde cellen in een metafaseachtig stadium van de mitose (c-metafase) te accumuleren. Er worden aan de lucht gedroogde chromosoompreparaten van de cellen vervaardigd en gekleurd, en de metafasen worden onder de microscoop op chromosoomafwijkingen geanalyseerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

De teststoffen worden in een fysiologische zoutoplossing opgelost. Indien zij onoplosbaar zijn, worden zij in geschikte oplosmiddelen opgelost of gesuspenseerd.

Vers bereide oplossingen van de teststof worden gebruikt. Indien men een oplosmiddel gebruikt om de toediening te vergemakkelijken, mag dit de teststof niet beïnvloeden of toxische effecten veroorzaken.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Er worden knaagdieren zoals ratten, muizen of Chinese hamsters gebruikt. Gezonde, jonge volwassen dieren worden aselekt gekozen en vervolgens in behandelings- en controlegroepen ingedeeld.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor elke behandelings- en controlegroep worden ten minste vijf wijfjes en vijf mannetjes gebruikt. Er worden aldus per periode tien dieren per groep gedood indien verscheidene intervallen testtijden-na-de-behandeling in het testschema zijn opgenomen. Bij de positieve controlegroep is een enkele bemonsteringstijd voldoende.

1.6.2.3. Wijze van toediening

De teststoffen worden in de meeste gevallen slechts eenmaal toegediend. Op basis van toxicologische gegevens kan een schema voor een herhaalde behandeling worden toegepast. Een herhaalde behandeling kan echter alleen worden toegepast indien de teststof geen cytotoxische effecten in het beenmerg vertoont. De gebruikelijke methoden voor toediening zijn : oraal of via intraperitoneale injectie. Ook andere wijzen van toediening kunnen in aanmerking komen.

1.6.2.4. Gebruik van negatieve en positieve controles

Als positieve controle wordt een stof gebruikt, waarvan men weet dat deze *in vivo* chromosoomafwijkingen veroorzaakt terwijl een negatieve controlegroep (oplosmiddel) ook tot de opzet van iedere proef behoort.

1.6.2.5. Dosisniveau

Voor het basisdossier wordt één dosis van de teststof gebruikt; deze dosis is de maximaal te verdragen dosis (MTD) of de dosis die een indicatie van cytotoxiciteit, bijvoorbeeld gedeeltelijke mitoseremming, geeft.

Voor "niet-toxische" stoffen is 2 000 mg/kg lichaamsgewicht de maximale (limiet)dosis die onderzocht moet worden na één toediening.

Indien het schema met herhaalde toediening wordt gebruikt, is de limietdosis 1 000 mg/kg lichaamsgewicht per dag.

Om wetenschappelijke redenen kunnen aanvullende dosisniveaus gebruikt worden.

Wanneer de test ter verificatie gebruikt wordt, dienen ten minste twee aanvullende dosisniveaus te worden gebruikt.

1.6.3. Uitvoering

De proef kan op twee manieren worden uitgevoerd :

i) De dieren worden eenmaal met de maximaal te verdragen dosis (MTD) van de teststof behandeld. In eerste instantie worden 24 uur na de behandeling monsters genomen. Wanneer de resultaten duidelijk positief zijn, kan verder bemonsteren onnodig zijn. Indien de resultaten echter negatief of onduidelijk zijn — de kinetiek van de celcyclus kan immers door de teststof worden beïnvloed — wordt een eerdere en een latere bemonsteringsperiode, voldoende gespreid in de tijd tussen 6 en 48 uur, na behandeling toegepast.

Wanneer aanvullende dosisniveaus worden gebruikt, dienen de monsters in de meest gevoelige perioden te worden genomen of, als die niet bekend zijn, 24 uur na de behandeling.

ii) Als op grond van farmacokinetische en metabole gegevens een schema voor herhaalde behandeling nodig is, kan een herhaalde dosering plaatsvinden en dienen de monsters tussen 6 en 24 uur na de laatste behandeling te worden genomen.

Beenmergpreparaat

Alvorens de dieren worden gedood, worden zij intraperitoneaal geïnjecteerd met een passende dosis spindle-remmer om een voldoende aantal cellen in de C-metafase te verkrijgen. Het beenmerg wordt uit de beide dijbenen van pas gedode dieren verkregen door spoelen met een isotone oplossing. Na een passende hypotonische behandeling worden de cellen gefixeerd en vervolgens op objectglasjes gespreid. Na droging aan de lucht worden de glasjes gekleurd.

Analyse

De glasjes worden voor de microscopische analyse gecodeerd. Ten minste 50 goedgespreide metafasen met het volledige aantal centromeren worden geanalyseerd op chromosoomafwijkingen. Bovendien kunnen voor elk dier de mitotische indexen worden vastgesteld.

2. GEGEVENS

De gegevens worden gepresenteerd in de vorm van tabellen. De afwijkingen van chromatide of isochromatide aard ('gaps', breuken, uitwisselingen), en de mitotische indexen, indien ze werden vastgesteld, worden voor alle behandelde en controledieren afzonderlijk genoteerd. Tevens worden gemiddelde aantallen en standaardafwijkingen voor elk van de proef- en controlegroepen genoteerd. De gegevens worden met behulp van passende statistische methoden geëvalueerd.

3. RAPPORTAGE**3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- soort, stam en leeftijd van de gebruikte dieren;
- aantal dieren per geslacht in de proef- en controlegroepen;
- proefomstandigheden : gedetailleerde beschrijving van het schema voor de behandeling en bemonstering, dosisniveaus, duur van de behandeling met en concentratie van de spindle-remmer;
- aantal per dier geanalyseerde metafasen;
- mitotische indexen, indien ze werden vastgesteld;
- soort en aantal afwijkingen, voor elk behandeld en controledier afzonderlijk;
- tekens van toxiciteit tijdens het verloop van de studie;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.12. MUTAGENITEIT (MICRONUCLEUSTEST)**1. METHODE****1.1. INLEIDING**

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De micronucleustest is een kortdurende test, die *in vivo* op zoogdieren wordt toegepast voor het vaststellen van chromosoombeschadiging of beschadiging van het mitotisch apparaat door de inwerking van chemische stoffen. Basis voor deze proef is de toename van het aantal micronuclei in de polychromatische erythrocyten van behandelde dieren vergeleken met de controledieren.

De micronuclei worden gevormd uit chromosoomfragmenten of gehele chromosomen die achterblijven in de mitose. Wanneer erythroblasten zich ontwikkelen tot erythrocyten, wordt de hoofdkern uitgestoten terwijl de micronucleus in het cytoplasma bewaard kan blijven. Bij deze proef worden jonge polychromatische erythrocyten in het beenmerg van laboratoriumzoogdieren, die op geschikte wijze aan de teststoffen zijn blootgesteld, gebruikt. Het beenmerg wordt uit een dijbeen gehaald, er worden uitstrijkjes vervaardigd en vervolgens gekleurd. Polychromatische erythrocyten worden onder de microscoop op micronuclei onderzocht, en vervolgens wordt de verhouding tussen polychromatische en normochromatische erythrocyten vastgesteld.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

De chemische teststoffen worden in een isotone oplossing opgelost; indien zij onoplosbaar zijn, worden zij in andere, passende media opgelost of gesuspenderd. Wanneer men een medium gebruikt, mag dit de teststof niet beïnvloeden of toxische effecten veroorzaken. Gewoonlijk worden vers bereide oplossingen van de teststof gebruikt.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Proefdieren

Muizen verdienen de voorkeur, maar ook andere zoogdieren kunnen worden gebruikt. Gezonde, jonge volwassen dieren worden aselect gekozen en vervolgens in behandelings- en controlegroepen ingedeeld.

1.6.2.2. Aantal en geslacht

Voor elke behandelings- en controlegroep worden ten minste vijf wijfjes en vijf mannetjes gebruikt. Er worden per blootstellingstijd tien dieren per groep gedood indien verscheidene testtijden-na-de-behandeling in het testschema zijn opgenomen. Bij de positieve controlegroep is een enkele blootstellingstijd voldoende.

1.6.2.3. Wijze van toediening

De teststoffen worden meestal slechts éénmaal toegediend. Op basis van toxicologische gegevens kan een schema voor een herhaalde behandeling worden toegepast. Een herhaalde behandeling kan echter alleen worden toegepast indien de teststof geen cytotoxische effecten in beenmerg teweeg brengt. De gebruikelijke methoden voor toediening zijn: oraal of via intraperitoneale injectie. Ook andere wijzen van toediening kunnen in aanmerking komen.

1.6.2.4. Gebruik van negatieve en positieve controles

Bij elke proef dienen zowel positieve als negatieve (oplosmiddel) controles te worden gebruikt.

1.6.2.5. Dosisniveau

Voor het basisdossier wordt één dosis van de teststof gebruikt; de dosis is de maximaal te verdragen dosis of de dosis die een indicatie van cytotoxiciteit geeft, bijvoorbeeld door verandering in de verhouding tussen polychromatische en normochromatische erythrocyten.

Voor « niet-toxische » stoffen is 2 000 mg/kg lichaamsgewicht de maximale (limiet)dosis die onderzocht moet worden na één toediening.

Indien het schema met herhaalde toediening wordt gebruikt, is de limietdosis 1 000 mg/kg lichaamsgewicht per dag.

Om wetenschappelijke redenen kunnen aanvullende doseringen gebruikt worden.

Wanneer de test ter verificatie gebruikt wordt, dienen ten minste twee aanvullende doseringen te worden gebruikt.

1.6.3. Procedure

De proef kan op twee manieren worden uitgevoerd :

i) De dieren worden éénmaal met de teststof behandeld. De bemonsteringstijden dienen samen te vallen met de maximale reactie van de test, die varieert met de teststof. Daarom worden ten minste tweemaal beenmergmonsters genomen, de eerste niet eerder dan 12 uur na de behandeling en de laatste niet later dan 48 uur.

Wanneer aanvullende doseringen worden gebruikt, dienen de beenmergmonsters in de meest gevoelige periode genomen te worden of, als die niet bekend is, 24 uur na de behandeling.

ii) Als op grond van de farmacokinetische en metabole gegevens een schema voor herhaalde behandeling nodig is, kan een herhaalde dosering plaatsvinden en dienen de beenmergmonsters ten minste één maal te worden genomen en niet eerder dan 12 uur na de laatste behandeling.

Beenmergbehandeling

Het beenmerg wordt verkregen uit de twee dijbenen van pas gedode dieren door uitspoelen met foetaal kalfsserum. De cellen worden gecentrifugeerd en het supernatans verwijderd. Druppels van de gehomogeniseerde celsuspensie worden op objectglaasjes gebracht en uitgestreken. Na droging aan de lucht worden de glaasjes gekleurd.

Analyse

De objectglaasjes worden voor de microscopische analyse gecodeerd. Per dier worden ten minste 1000 polychromatische erythrocyten onderzocht op de aanwezigheid van micronuclei.

De verhouding tussen normochromatische en polychromatische erythrocyten wordt voor elk dier bepaald door een totaal van 1000 erythrocyten te tellen.

2. GEGEVENS

De gegevens worden in de vorm van tabellen gepresenteerd. Het aantal aldus gevonden polychromatische erythrocyten, het aantal polychromatische erythrocyten met micronuclei, en het percentage cellen met micronuclei worden afzonderlijk vermeld voor alle behandelde en controledieren en dat geldt ook voor de verhouding tussen normochromatische en polychromatische erythrocyten. Tevens worden voor elk van de proef- en controlegroepen gemiddelde aantallen en standaardafwijkingen vermeld. De gegevens worden met behulp van geschikte statistische methoden geëvalueerd.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- soort, stam en leeftijd van de gebruikte dieren;
- aantal dieren per geslacht in de proef- en controlegroepen;
- proefomstandigheden : gedetailleerde beschrijving van de behandeling en beenmergafname, dosisniveaus, toxiciteitsgegevens, negatieve en positieve controles;
- criteria voor het scoren van micronuclei;
- indien mogelijk, dosis/effect-relatie;
- tekens van toxiciteit tijdens het verloop van de studie;
- statistische evaluatie;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.13. MUTAGENITEIT (ESCHERICHIA COLI) — TERUGMUTATIETEST

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het tryptofaan-terugmutatiesysteem van *Escherichia coli* (*trp*) is een microbiologische test waarbij de terugmutatie $trp^- \rightarrow trp^+$ onder invloed van chemische stoffen, die baseveranderingen in het genetisch materiaal van het organisme veroorzaken, wordt gemeten.

De bacteriën worden met en zonder metabole activering blootgesteld aan de teststof. Na een geschikte incubatietijd op een minimale voedingsbodem worden de terugmutantkolonies geteld en vergeleken met het aantal spontane terugmutanten in een onbehandelde cultuur en/of in een cultuur behandeld met oplosmiddel.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Voor het verrichten van de bepaling kunnen de volgende methoden worden toegepast: (1) de pre-incubatiemethode; en (2) de directe methode, waarbij de bacteriën en de te testen stof met de agar worden gemengd en over het oppervlak van een selectieve agarplaat worden uitgegoten.

1.6.1. Voorbereidingen

1.6.1.1. Bacteriën

De bacteriën worden gekweekt bij 37 °C tot de laat-exponentiële of de vroeg-stationaire groeifase. De celdichtheid dient circa 10^8 - 10^9 cellen per milliliter te zijn.

1.6.1.2. Metabole activering

De bacteriën dienen aan de teststof te worden blootgesteld zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem. Het meest algemeen gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie verrijkt met een cofactor, verkregen uit de lever van knaagdieren die behandeld werden met enzyminducerende stoffen.

1.6.2. Proefomstandigheden

1.6.2.1. Teststammen

Drie stammen, te weten WP2, WP2 uvr A en WP2 uvr A pKM 101, dienen te worden gebruikt. Er moeten erkende methoden voor bereiding van voorraadculturen en opslag worden gebruikt. De eisen inzake de groei en de genetische identiteit van de stammen, hun gevoeligheid voor UV-straling of mitomycine C en de resistentie tegen ampicilline in stam WP2 uvr A pKM 101 dienen te worden gecontroleerd. De frequentie van spontane terugmutanten van de verschillende bacteriënstammen dient te liggen binnen de verwachte grenzen.

1.6.2.2. Voedingsbodems

Een voor de uitdrukking en selectie van mutanten geschikte voedingsbodem wordt gebruikt met een toereikende topagar.

1.6.2.3. Gebruik van negatieve en positieve controles

Testen met onbehandelde controles en controles met oplosmiddel dienen gelijktijdig te worden uitgevoerd. Positieve controles moeten tevens worden uitgevoerd om twee redenen :

i) Om de gevoeligheid van de bacteriestammen te bevestigen.

Methylmethaansulfonaat, 4-nitrochinolineoxide of ethylnitrosourem kunnen als positieve controles voor testen zonder metabole activering worden gebruikt.

ii) Om de activiteit van het geschikte metaboliseringssysteem te controleren.

Een positieve controle voor de activiteit van één metaboliseringssysteem voor alle bacteriestammen is 2-aminoanthraцен. Als een positieve controlestof van dezelfde chemische klasse als de teststof voorhanden is dient deze te worden gebruikt.

1.6.2.4. Hoeveelheid teststof per plaat

Ten minste vijf verschillende hoeveelheden van de teststof worden getest met half-log-intervallen tussen de platen. De stoffen worden getest tot de grens van oplosbaarheid of toxiciteit is bereikt. De toxiciteit blijkt uit de vermindering van het aantal spontane terugmutanten, de opheldering van de achtergrond of uit de mate van overleving van behandelde culturen. Niet-toxische stoffen dient men te testen tot 5 mg per plaat alvorens de te testen stof als negatief te evalueren.

1.6.2.5. Incubatieomstandigheden

De platen worden 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C.

1.6.3. Uitvoering

Voor de methode waarbij de te testen stof direct aan de plaat wordt toegevoegd zonder enzymactivering worden de teststof en 0,1 ml van een verse bacteriecultuur toegevoegd aan 2,0 ml topagar. Voor proeven met metabole activering wordt 0,5 ml leverenzymactiveringsmengsel met een voldoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie toegevoegd aan de topagar nadat de te testen stof en de bacteriën zijn toegevoegd. De inhoud van elk van de buisjes wordt gemengd en uitgegoten over het oppervlak van een selectieve agarplaat. De topagar krijgt de gelegenheid te stollen, en vervolgens worden de platen 48 à 72 uur bij 37 °C geïncubeerd. Aan het einde van de incubatietijd telt men de terugmutantkolonies per plaat.

Voor de preïncubatiemethode wordt een mengsel van de te testen stof, 0,1 ml van een verse bacteriecultuur en een voldoende hoeveelheid leverenzymactiveringsmengsel of dezelfde hoeveelheid buffer gepreïncubeerd alvorens 2,0 ml topagar wordt toegevoegd. Alle overige procedures verlopen zoals hierboven voor de directe methode is aangegeven.

Bij beide methoden dient het uitplaten ten minste in drievoud te geschieden.

2. GEGEVENS

De aantallen terugmutantkolonies per plaat worden zowel voor de controleculturen als voor de behandelde culturen gerapporteerd.

Individuele plaattellingen, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en standaardafwijkingen dienen voor de teststof en voor de controles te worden opgegeven.

De gegevens dienen aan de hand van geschikte statistische methoden te worden geëvalueerd.

Ten minste twee onafhankelijke onderzoeken dienen te worden uitgevoerd. Het is niet noodzakelijk het tweede onderzoek op identieke wijze als het eerste uit te voeren. Het kan zelfs wenselijk zijn om bepaalde testvoorwaarden te veranderen om aldus meer bruikbare gegevens te verkrijgen.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag van de proefnemingen moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- gebruikte bacteriestam;
- proefomstandigheden : dosisniveaus, toxiciteit, samenstelling van de voedingsbodem, behandelingsprocedures (preïncubatie, incubatie), metabool activeringssysteem, referentiestoffen, negatieve controles;
- individuele plaattelling, gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat, standaardafwijking; dosis/effect-relatie als dat mogelijk is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

B.14. MUTAGENITEIT (SALMONELLA TYPHIMURIUM—TERUGMUTATIE TEST)

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Zie algemene inleiding deel B (punt A).

1.2. DEFINITIES

Zie algemene inleiding deel B (punt C).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Geen.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Het histidinerugmutatiesysteem van *Salmonella typhimurium* (his) is een microbiologische test, waarbij de terugmutatie his⁻ → his⁺ wordt gemeten onder invloed van chemische stoffen die basesubstituties of « Frameshift »-mutaties in het genetisch materiaal van het organisme veroorzaken.

De bacteriën worden met en zonder metabole activering blootgesteld aan de teststof, en op een minimale voedingsbodem uitgeplaat. Na een geschikte incubatietijd worden de terugmutantkolonies geteld en vergeleken met het aantal spontane terugmutanten in een onbehandelde cultuur en/of in een cultuur met oplosmiddel.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Geen.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Voorbereidingen

1.6.1.1. Bacteriën

Verse culturen van bacteriën worden bij 37 °C gekweekt tot de laat-exponentiële of vroeg-stationaire groeifase. De celdichtheid dient bij benadering 10⁸ tot 10⁹ cellen per milliliter te zijn.

1.6.1.2. Metabole activering

De bacteriën dienen aan de teststof te worden blootgesteld zowel met als zonder een geschikt metabool activeringssysteem. Het meest algemeen gebruikte systeem is een post-mitochondriale fractie verrijkt met een cofactor, verkregen uit de lever van knaagdieren die behandeld werden met enzyminducerende stoffen.

1.6.2. Proefomstandigheden**1.6.2.1. Teststammen**

Op zijn minst moeten vier bacteriestammen : TA 1535, TA 1537 of TA97, TA 98 en TA 100 worden gebruikt; daarnaast mogen ook nog andere stammen, zoals TA 1538 en TA 102, worden gebruikt. Er moeten erkende methoden voor de bereiding en de opslag van de voorraadculturen worden gebruikt. De groeiomstandigheden en de genetische identiteit van de stammen, hun gevoeligheid voor UV-straling en kristalviolet en de resistentie tegen ampicilline dienen te worden gecontroleerd. De frequentie van spontane terugmutanten dient te liggen binnen de te verwachten grenzen.

1.6.2.2. Voedingsbodems

Een geschikte selectieve voedingsbodem wordt gebruikt, met een toereikende topagar.

1.6.2.3. Gebruik van negatieve en positieve controles

Testen met onbehandelde controles en controles met oplosmiddel, dienen gelijktijdig te worden uitgevoerd. Positieve controles moeten tevens worden uitgevoerd om twee redenen :

i) Om de gevoeligheid van de bacteriestammen te bevestigen.

De volgende verbindingen kan men gebruiken voor tests zonder metabole activering :

Bacteriestam	Muteert terug met
TA 1535, TA 100	natriumazide
TA 1538, TA 98, TA 97	2-nitrofluoreen
TA 1537	9-aminoacridine
TA 102	cumeenhydroperoxide

ii) om de activiteit van het geschikte metaboliseringssysteem te controleren.

Een positieve controle voor de activiteit van één metaboliseringssysteem voor alle bacteriestammen is 2-aminoanthraceen. Als een positieve controlestof van dezelfde chemische klasse als de teststof voorhanden is dient deze te worden gebruikt.

1.6.2.4. Hoeveelheid teststof per plaat

Ten minste vijf verschillende hoeveelheden teststof worden getest met halflogintervallen tussen de platen. De stoffen worden getest tot de grens van oplosbaarheid of toxiciteit is bereikt. De toxiciteit blijkt uit de vermindering van het aantal spontane terugmutanten, de opheldering van de achtergrond of uit de mate van overleving van de behandelde culturen. Niet-toxische chemicaliën dient men te testen tot 5 mg per plaat, alvorens de te testen stof als negatief te beschouwen.

1.6.2.5. Incubatieomstandigheden

De platen worden 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C.

1.6.3. Procedure

Voor de methode waarbij de te testen stof direct aan de plaat wordt toegevoegd zonder enzymactivering, worden de teststof en 0,1 ml van de verse bacteriecultuur toegevoegd aan 2,0 ml topagar. Voor proeven met metabole activering wordt 0,5 ml van het leverenzymactiveringsmengsel, dat een voldoende hoeveelheid post-mitochondriale fractie bevat, toegevoegd aan de topagar nadat de te testen stof en de bacteriën zijn toegevoegd. De inhoud van ieder buisje wordt gemengd en uitgegoten over de oppervlakte van een selectieve agarplaat. De topagar krijgt de gelegenheid om te stollen, en vervolgens worden de platen 48 à 72 uur geïncubeerd bij 37 °C. Aan het einde van de incubatieperiode worden de terugmutantkolonies per plaat geteld. Voor de preïncubatie wordt een mengsel van de teststof, 0,1 ml verse bacteriecultuur en een toereikende hoeveelheid leverenzymactiveringsmengsel of dezelfde hoeveelheid buffer gepreïncubeerd, alvorens 2,0 ml topagar wordt toegevoegd. Alle overige procedures verlopen zoals hierboven voor de directe methode is aangegeven.

Bij beide methoden dient het uitplaten ten minste in drievoud te geschieden.

2. GEGEVENS

Het aantal terugmutantkolonies per plaat wordt zowel voor de controlereeks als voor de behandelde reeks gemeld.

Voor de teststof en de controles dienen individuele plaattellingen, het gemiddelde aantal terugmutantkolonies per plaat en standaardafwijkingen te worden opgegeven.

De gegevens dienen aan de hand van een geschikte statistische methode te worden geëvalueerd.

Ten minste twee onafhankelijke onderzoeken dienen te worden uitgevoerd. Het is niet noodzakelijk een tweede onderzoek identiek aan het eerste uit te voeren. Het kan dan wenselijk zijn om bepaalde testvoorwaarden te veranderen om aldus meer bruikbare gegevens te verkrijgen.

3. RAPPORTAGE**3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN**

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- gebruikte bacteriestam;
- proefomstandigheden : dosisniveaus, toxiciteit, samenstelling van de voedingsbodem, behandelingsprocedures (preïncubatie, incubatie), metabool activeringssysteem, referentiestoffen, negatieve controles;
- individuele plaattelling, gemiddeld aantal terugmutantkolonies per plaat, standaardafwijking; dosis/effect-relatie als dat mogelijk is;
- bespreking van de resultaten;
- interpretatie van de resultaten.

3.2. EVALUATIE EN INTERPRETATIE

Zie algemene inleiding deel B (punt-D).

4. LITERATUUR

Zie algemene inleiding deel B (punt E).

DEEL C : METHODEN VOOR DE BEPALING VAN DE ECOTOXICITEIT

C.1. ACUTE TOXICITEIT VOOR VISSSEN

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de acute letale toxiciteit van een stof voor vissen in zoet water. Met het oog op de keuze van de testmethode (statisch, semi-statisch of doorstroming) die het meest geschikt is om concentraties van de teststof gedurende de testperiode voldoende constant te houden, is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de teststof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met aanvullende gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de n-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Acute toxiciteit is het waarneembare schadelijke effect dat in een organisme wordt teweeggebracht binnen een korte tijd (dagen) van blootstelling aan een stof. In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan letale concentratie (LC_{50}), dat wil zeggen de concentratie in water waardoor 50 % van een groep vissen in de proef wordt gedood binnen een continue blootstellingsperiode, die moet worden vermeld.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg/kg^{-1}).

1.3. REFERENTESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de respons van geteste diersoorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

Voor deze test worden geen referentiestoffen gespecificeerd.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd, om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

De vissen worden gedurende 96 uur blootgesteld aan de teststof die in een reeks concentraties aan het water is toegevoegd. De sterfte wordt ten minste elke 24 uur genoteerd en de concentraties waarbij 50 % van de vissen sterft (LC_{50}) wordt indien mogelijk berekend voor elke waarnemingstijd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volledige test van toepassing.

De sterfte in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 % (of één vis indien minder dan tien worden gebruikt).

Het zuurstofgehalte moet gedurende de gehele test meer dan 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht zijn geweest.

De concentraties van de geteste stof dienen gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentraties gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen geven en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentraties beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentratie gedurende de gehele test gehandhaafd werden en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Voor stoffen die :

(i) moeilijk oplosbaar zijn in het testmedium

of

(ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen

of

(iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen,

dient de bij het begin van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie moet na een equilibratieperiode maar voordat de proefvissen worden ingebracht, worden bepaald.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

De pH mag met meer dan 1 eenheid variëren.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Er kunnen drie verschillende procedures worden toegepast :

Statische test :

Toxiciteitstest waarbij de te onderzoeken oplossing niet stroomt. (Oplossingen blijven ongewijzigd gedurende de test.)

Semi-statische test :

Test waarbij de oplossing niet stroomt, maar de testoplossing periodiek per bak wordt ververs na een langere periode (bijvoorbeeld 24 uur).

Doorstroomtest :

Toxiciteitstest waarin het water voortdurend wordt ververs in de testbakken waarbij de te onderzoeken stof wordt meegevoerd met het water ten einde het testmedium te verversen.

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door verdunning van de stamoplossing. Indien hoge concentraties worden getest, kan de te onderzoeken stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De stoffen moeten normaal gezien slechts worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow} , of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een echte oplossing in water) is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidslimiet van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water verhinderd wordt).

Ultrasonische dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water, of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controlevissen worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt geadviseerd om de test te herhalen met gecorrigeerde pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien ten gevolge van de correctie een chemische reactie of fysieke neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

1.6.1.2. Voorraad en verdunningswater

Leidingwater (waarin geen chloor, zware metalen of andere stoffen in mogelijk schadelijke concentraties mogen voorkomen), goede kwaliteit natuurlijk water of synthetisch water (zie aanhangsel 1) kunnen worden gebruikt. Water met een totale hardheid van 10 tot 250 mg per liter (als CaCO_3) en met een pH van 6,0 tot 8,5 verdient de voorkeur.

1.6.2. Apparatuur

Alle apparatuur dient te zijn vervaardigd van chemisch inert materiaal.

- Automatisch verdunningsstelsel (voor doorstroomtest).
- Zuurstofmeter.
- Apparatuur voor de bepaling van de hardheid van water.
- Apparatuur voor de temperatuurbeheersing.
- pH-meter.

1.6.3. Testvissen

De vissen dienen gezond te zijn en vrij van elke waarneembare misvorming.

Het verdient aanbeveling de te gebruiken soorten te selecteren op basis van relevante praktische overwegingen, zoals goede beschikbaarheid gedurende het gehele jaar, goede houdbaarheid, geschiktheid voor testdoeleinden, relatieve gevoeligheid voor chemische stoffen, alsmede alle economische, biologische of ecologische factoren die van belang zijn. Tevens dient bij de keuze van de vissoort rekening gehouden te worden met de behoefte aan vergelijkbaarheid van de verkregen gegevens en met de bestaande internationale harmonisering (referentie 1).

Een lijst met voor de uitvoering van de onderhavige test aanbevolen vissoorten staat vermeld in aanhangsel 2; de zebravis en de regenboogforel hebben de voorkeur.

1.6.3.1. Het houden van voorraad

Testvissen dienen bij voorkeur afkomstig te zijn van één partij, met ongeveer dezelfde lengte en leeftijd. De vissen moeten ten minste 12 dagen onder de volgende omstandigheden worden bewaard :

Hoeveelheid vis per liter :

aangepast aan het systeem (recirculatie of doorstroming) en de vissoort,

Water :

zie 1.6.1.2,

Licht :

per dag een belichtingsperiode van 12 à 16 uur,

Zuurstofgehalte :

ten minste 80 % van de verzadigingswaarde voor lucht,

Voeren :

drie keer per week of dagelijks; dit wordt 24 uur voor het begin van de test stopgezet.

1.6.3.2. Sterfte

Na een gewenningsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd, waarbij de volgende criteria worden gehanteerd :

- in 7 dagen meer dan 10 % van de populatie :

de gehele partij wordt afgekeurd;

- 5 tot 10 % van de populatie :

de periode van het in voorraad houden wordt met nog 7 dagen verlengd. Indien geen nieuwe sterfgevallen optreden, wordt de partij goedgekeurd. Anders dient deze te worden afgekeurd;

- minder dan 5 % van de populatie :

de partij wordt goedgekeurd.

1.6.4. Aanpassing

Alle vissen moeten gedurende ten minste 7 dagen voor het gebruik worden blootgesteld aan water van de kwaliteit en de temperatuur zoals dat in de test zal worden gebruikt.

1.6.5. Testprocedure

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.

Naast de testreeks wordt een controlegroep zonder de teststof uitgevoerd en, indien van toepassing, ook een controlegroep met de hulpstof.

Afhankelijk van de fysische en chemische eigenschappen van de teststof kan gekozen worden voor een statische, semi-statische of doorstroomtest om aan de kwaliteitscriteria te voldoen.

Vissen worden als volgt aan de stof blootgesteld :

- Tijdsduur : 96 uur,
- Aantal dieren : ten minste 7 per concentratie,
- Bakken : van een capaciteit die in overeenstemming is met de aanbevolen hoeveelheid vis per liter,
- Hoeveelheid vis per liter : een maximale bezettingsgraad van 1,0 g per liter voor statische en semi-statische tests wordt aanbevolen; voor doorstroomsystemen kan een grotere hoeveelheid vis per liter aanvaardbaar zijn,
- Testconcentratie : ten minste vijf concentraties die verschillen met een constante welke niet groter is dan 2,2 en die zo mogelijk het gebied met een sterfte van 0 % tot 100 % bestrijken,
- Water : zie 1.6.1.2,
- Licht : dagelijks een belichtingsperiode van 12 à 16 uur,
- Temperatuur : aangepast aan de soort (Aanhangsel 2); voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen ± 1 °C.
- Zuurstofgehalte : ten minste 60 % van de verzadigingswaarde voor lucht bij de gekozen temperatuur,
- Voeren : achterwege laten.

De vissen worden gecontroleerd na de eerste 2 tot 4 uur en ten minste elke 24 uur. Vissen worden geacht dood te zijn indien aanraking van de staartwortel geen reactie teweeg brengt en geen ademhalingsbewegingen zichtbaar zijn. Dode vissen worden, zodra zij zijn opgemerkt, verwijderd en de sterfte wordt geregistreerd.

Er wordt aantekening gemaakt van zichtbare afwijkingen (bijvoorbeeld evenwichtsverlies, veranderingen in zwemgedrag, ademhalingsfunctie, pigmentatie enzovoort).

De pH, zuurstofconcentratie en temperatuur moeten dagelijks worden gemeten.

Limiettest

Gebruik makend van de procedure zoals beschreven in deze methode, kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de LC_{50} groter is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd met een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient te worden uitgevoerd met 7 à 10 vissen en eenzelfde aantal in de controlegroepen. (De binomiale theorie schrijft voor dat als bij gebruik van 10 vissen geen sterfte optreedt, de LC_{50} met een betrouwbaarheid van 99,9 % groter is dan de in de limiettest gebruikte concentratie. Met 7, 8 of 9 vissen geeft de afwezigheid van sterfte een betrouwbaarheid van ten minste 99 % dat de LC_{50} groter is dan de gebruikte concentratie.)

Indien sterfte optreedt, dient een volledige test te worden uitgevoerd. Indien subletale effecten worden waargenomen, dienen deze te worden vermeld.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet voor elke aanbevolen blootstellingsperiode op logaritmisches-waarschijnlijkheidspapier voor elk tijdstip waarop waarnemingen werden geregistreerd (24, 48, 72 en 96 uur) het sterftepercentage uit tegen de concentratie.

De LC_{50} en de betrouwbaarheidsintervallen ($p = 0,05$) dienen zo mogelijk voor iedere waarnemingsperiode geschat te worden met behulp van standaardprocedures; deze waarden moeten worden afgerond tot op één, of ten hoogste twee significante cijfers (voorbeelden voor afronding op twee cijfers : 170 voor 173,5; 0,13 voor 0,127; 1,2 voor 1,21).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/respons-percentages-kromme te steil is voor een berekening van de LC_{50} -waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2,2 slechts een sterfte van 0 respectievelijk 100 % geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de LC_{50} ligt.

Indien blijkt dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen :

- gegevens over de testvis (wetenschappelijke naam; stam; leverancier; eventuele voorbehandeling; afmeting en aantal dat voor elke testconcentratie gebruikt is;
- herkomst van het verdunningswater alsmede belangrijkste chemische kenmerken (pH, hardheid, temperatuur);
- voor stoffen met een geringe oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;
- concentratie van eventuele hulpstoffen;
- lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit bij de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossing;
- als chemische analyses zijn uitgevoerd, dienen de toegepaste methoden en de verkregen resultaten te worden vermeld;
- de resultaten van de limiettest, indien van toepassing;
- redenen voor de keuze van de testprocedure alsmede verdere details (bijvoorbeeld statisch, semi-statisch, doseersnelheid, doorstroomsnelheid, of er belucht is, hoeveelheid vis per liter, enzovoort);
- beschrijving van de testuitrusting;
- lichtregime;
- voor iedere 24 uur het zuurstofgehalte, de pH-waarde en de temperatuur van de testoplossingen;
- gegevens om aan te tonen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan;
- een tabel met de cumulatieve mortaliteit voor elke concentratie en voor de controlegroepen (en, zo nodig, voor de controlegroep met hulpstof) op elke aanbevolen waarnemingstijd;
- grafiek van de concentratie/responspercentages-kromme aan het einde van de test;

- zo mogelijk, de LC₅₀-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met de 95 % betrouwbaarheids-grenzen);
- statistische procedures voor de bepaling van de LC₅₀-waarden;
- als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen sterfte veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100 % sterfte veroorzaakte.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 Final and updates.
- (2) AFNOR—Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.
- (3) AFNOR—Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.
- (4) ISO 7346/1, /2 en /3 — Water Quality—Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1 : Static method. Part 2 : Semi-static method. Part 3 : Flow-through method.
- (5) Eidgenössisches Departement des Innern, Schweiz : Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.
- (6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 L(1) und L(15)
- (7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- (8) NEN 6506—Water—Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- (9) Environmental Protection Agency, Methods for the Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates and Amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- (10) Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Office of Research and Development. EPA-600/4-78-012, January 1978.
- (11) Environmental Protection Agency : Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- (12) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- (13) 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.
- (14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.
- (16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
- (17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- (18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.
- (19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC₅₀ In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- (20) Stephan, C.E., Bush, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

Aanhangsel I

Synthetisch water

Voorbeeld van een geschikt verdunningswater

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedistilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan 5 μScm^{-1} .

Het toestel voor de distillatie van water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Stamoplossingen

CaCl₂ · 2H₂O (calciumchloridedihydraat) 11,76 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

MgSO₄ · 7H₂O (magnesiumsulfaatheptahydraat) 4,93 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

NaHCO₃ (natriumwaterstofcarbonaat) 2,59 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

KCl (kaliumchloride) 0,23 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

Synthetisch verdunningswater

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen en vul met water aan tot 1 liter.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet 7,8 ± 0,2 bedragen.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (zoutzuur).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en behoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol per liter. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4 : 1 en die van de Na- en K-ionen 10 : 1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol per liter.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

Aanhangsel 2

Voor tests aanbevolen vissoorten

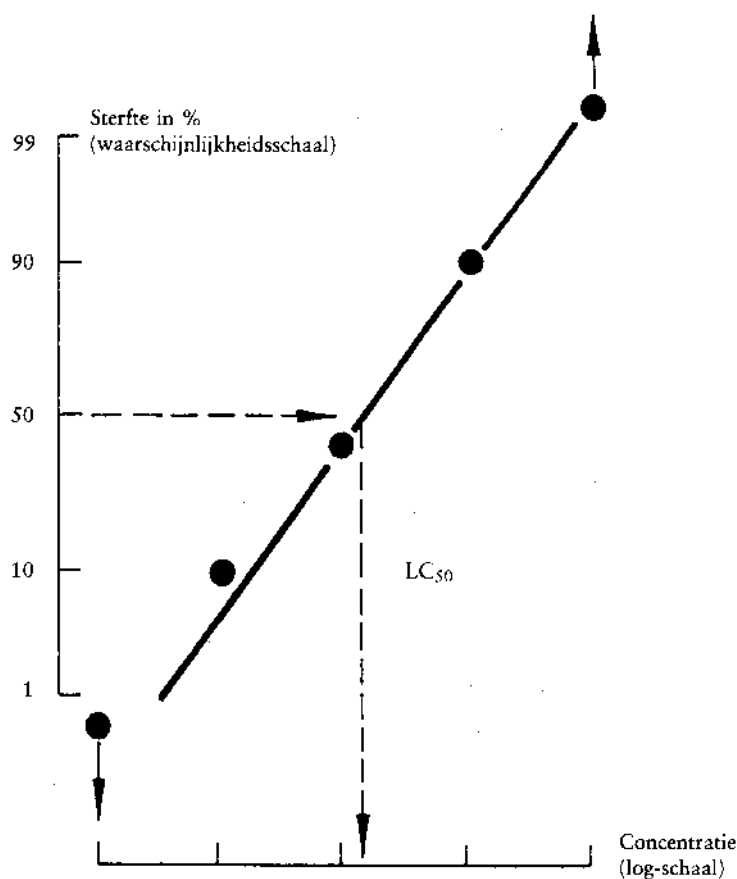
Aanbevolen soort	Aanbevolen testtemperatuur (°C)	Aanbevolen totale lengte van het proefdier (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis	20-24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Modderkruiper	20-24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Gewone karper	20-24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Japans rijstvisje	20-24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20-24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Zonnebaars	20-24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Regenbogenforel	12-17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Goudwinde	20-24	6,0 ± 2,0

Herkomst

Bovengenoemde vissen laten zich gemakkelijk kweken en/of zijn het gehele jaar ruim verkrijgbaar. Zij kunnen worden geteeld en gekweekt in viskwekerijen of in het laboratorium onder omstandigheden waarbij ziektekiemen en parasieten onder controle gehouden worden, zodat de proefdieren gezond zijn en hun afkomst bekend is. Deze vissen zijn in veel delen van de wereld beschikbaar.

Aanhangsel 3

Voorbeeld van een concentratie / sterftepercentage — kromme

Voorbeeld van de bepaling van de LC₅₀-waarde met logaritmisches-waarschijnlijkheidspapier

C.2. ACUTE TOXICITEIT VOOR DAPHNIA

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de mediaan van de effectieve concentratie van een stof (EC₅₀) waarbij immobilisatie van *Daphnia* in zoet water optreedt. Alvorens de test te beginnen is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de stof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met verdere gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van van belang zijnde verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheden van additieven en de *n*-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Aan de eis van de richtlijn met betrekking tot de LC₅₀ voor *Daphnia* wordt beschouwd te zijn voldaan door de bepaling van de EC₅₀ zoals beschreven in deze testmethode.

In deze test wordt de acute toxiciteit uitgedrukt als de mediaan van de effectieve concentratie (EC₅₀) voor immobilisatie. Dit is de concentratie (uitgaande van de beginwaarden) waarbij 50 % van de *Daphnia*'s in een testgroep wordt geïmmobiliseerd binnen een ononderbroken blootstellingsperiode die moet worden aangegeven.

Immobilisatie

Dieren die niet tot zwemmen in staat zijn binnen 15 seconden na zachtjes bewegen van het testvat, worden geacht immobiel te zijn.

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg.kg⁻¹).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van geteste soorten onder laboratoriumomstandigheden niet in belangrijke mate is veranderd.

De samenvatting van de resultaten van een EEG-ringtest, waarbij gebruik gemaakt werd van vier verschillende stoffen, wordt gegeven in aanhangsel 2.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd om aan te tonen dat de EC₅₀ hoger is dan deze concentratie.

De *Daphnia* worden gedurende 48 uur blootgesteld aan de teststof die aan het water is toegevoegd in een aantal uiteenlopende concentraties; indien een kortere test wordt gebruikt moet een verantwoording hiervoor gegeven worden in het testrapport.

Als de concentraties van de teststof een geschikt gebied beslaan, zal onder overigens gelijke testomstandigheden het zwemvermogen van de *Daphnia* door verschillende concentraties van de teststof gemiddeld in verschillende mate worden beïnvloed. Verschillende concentraties hebben tot gevolg dat verschillende percentages *Daphnia* niet meer kunnen zwemmen aan het einde van de test. De concentraties die 0 of 100 % immobilisatie veroorzaken, worden rechtstreeks afgeleid uit de waarnemingen; de 48-uur EC₅₀ wordt daarentegen zo mogelijk door berekening bepaald.

Voor deze methode wordt een statisch systeem gebruikt. Testoplossingen worden dan ook niet vernieuwd tijdens de blootstellingsperiode.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volledige test van toepassing.

De immobilisatie in de controlegroepen mag aan het einde van de test niet hoger zijn dan 10 %.

De proef-*Daphnia* in de controlegroepen mogen niet vastzitten aan het wateroppervlak.

Het is wenselijk dat gedurende het hele testverloop de opgeloste zuurstofconcentratie in de proefvaten boven 3 mg l⁻¹ blijft. Onder geen enkele voorwaarde mag de opgeloste zuurstofconcentratie echter lager worden dan 2 mg l⁻¹.

De concentratie van de teststof dient gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentratie gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen vormen en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentratie beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentraties gedurende de gehele test gehandhaafd zijn en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Bij stoffen die :

(i) slecht oplosbaar zijn in het testmedium

of

(ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen

of

(iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen,

dient de bij het begin van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie dient te worden bepaald na een periode van evenwichtinstelling, maar voor het uitzetten van de proeforganisme.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

De pH mag met niet meer dan 1 eenheid variëren.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door verdunning van de stamoplossingen. Indien hoge concentraties worden getest, kan de te onderzoeken stof rechtstreeks worden opgelost in het verdunningswater.

De stoffen moeten normaal gezien slechts worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow}, of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een ware oplossing in water) is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidsgrens van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water wordt verhinderd, enzovoorts).

Ultrasonische dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten en moeten extra controle-*Daphnia* worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt aangeraden om de test te herhalen na correctie van de pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld in het rapport.

1.6.1.2. Testwater

In deze test wordt synthetisch water gebruikt (zie aanhangsel 1 en referentie (2): ISO 6341). Om de noodzaak van acclimatisering vóór de test te vermijden wordt aanbevolen om voor de kweek water van dezelfde kwaliteit (pH, hardheid) te gebruiken als voor de test.

1.6.2. Apparatuur

Er moet gebruik worden gemaakt van gangbare laboratoriumapparatuur en uitrusting. Materiaal dat rechtstreeks in contact komt met de testoplossingen moet bij voorkeur volledig van glas zijn.

— Zuurstofmeter (met micro-elektrode of andere geschikte voorzieningen voor de meting van opgeloste zuurstof in monsters met een klein volume);

— Adequate apparatuur voor de temperatuurbeheersing;

— pH-meter;

— Uitrusting voor de bepaling van de hardheid van water.

1.6.3. Testorganisme

De testsoort is bij voorkeur *Daphnia magna*, alhoewel *Daphnia pulex* ook is toegestaan. De testdieren moeten bij het begin van de test minder dan 24 uur oud, in het laboratorium gekweekt en vrij van zichtbare ziekten zijn, en een bekende voorgeschiedenis hebben (bijvoorbeeld kweek, eventuele voorbehandelingen enzovoort).

1.6.4. Testprocedure

Een definitieve test kan worden voorafgegaan door een test om het meetgebied vast te stellen. Deze verschaft gegevens over de voor de eigenlijke test te gebruiken reeks concentraties.

Naast de testreeks wordt één controlegroep zonder de teststof getest en, indien van toepassing, ook één controlegroep met de hulpstof.

Daphnia worden als volgt aan de stof blootgesteld :

— *Tijdsduur* : bij voorkeur 48 uur.

— *Aantal dieren* : ten minste 20 dieren bij iedere testconcentratie, bij voorkeur ingedeeld in vier groepen van vijf dieren of in twee groepen van tien.

— *Benodigd volume* : ten minste 2 ml testoplossing dient per dier te worden gerekend.

— *Testconcentratie* : de testoplossing moet onmiddellijk voor het toevoegen van de *Daphnia* worden bereid, bij voorkeur zonder gebruik te maken van andere oplosmiddelen dan water. De concentraties worden zo bereid dat ze een meetkundige reeks vormen, met een concentratie-verhouding die 2,2 niet overschrijdt. Concentraties voldoende voor 0 % en 100 % immobilisatie na 48 uur dienen te worden getest, alsmede een reeks tussenliggende graden van immobilisatie, aan de hand waarvan de EC₅₀-waarde na 48 uur kan worden berekend. Daarnaast dienen controlegroepen te worden getest.

— *Water* : zie 1.6.1.2.

— *Licht* : een licht-donker cyclus naar keuze.

— *Temperatuur* : de testtemperatuur moet tussen 18 en 22 °C liggen, maar voor iedere afzonderlijke test moet de temperatuur evenwel constant blijven binnen ± 0,1 °C.

— *Beluchting* : de testoplossing mag niet met luchtbellen worden belucht.

— *Voeren* : achterwege laten.

De pH en de zuurstofconcentratie van de controles en alle testconcentraties moeten na afloop van de test gemeten worden; de pH van de testoplossingen mag niet worden gewijzigd.

Vluchtige stoffen moeten worden getest in volledig gevulde, afgesloten vaten, die groot genoeg zijn om zuurstofgebrek te voorkomen.

De *Daphnia* worden in ieder geval geïnspecteerd na een blootstelling van 24 uur en nogmaals na 48 uur.

Limiettests

Met de in deze methode beschreven procedures kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de EC₅₀ hoger is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd bij een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient te worden uitgevoerd met 20 *Daphnia*, ingedeeld in twee of vier groepen, en hetzelfde aantal in de controlegroep(en). Indien immobilisatie optreedt, dient een volledige studie te worden uitgevoerd.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Zet voor elk tijdstip waarop waarnemingen werden geregistreerd (24 en 48 uur) het sterftepercentage uit tegen de concentratie op logaritmic-waarschijnlijkheidspapier.

De EC₅₀ en de betrouwbaarheidsintervallen (p = 0,05) dienen zo mogelijk voor iedere waarnemingsperiode geschat te worden met behulp van standaardprocedures; deze waarden moeten worden afgerond tot op één, of ten hoogste twee significante cijfers (voorbeelden voor afronding op twee cijfers : 170 voor 173,5; 0,13 voor 0,127; 1,2 voor 1,21).

In die gevallen waarin de helling van de concentratie/responspercentage-kromme te steil is voor een berekening van de EC₅₀-waarde, is een grafische schatting van deze waarde voldoende.

Indien twee opeenvolgende concentraties met een onderlinge verhouding van 2,2 slechts 0 respectievelijk 100 % immobilisatie geven, dan zijn deze waarden voldoende om aan te geven in welk gebied de EC₅₀ ligt.

Indien blijkt dat de stabiliteit of homogeniteit van de teststof niet kan worden gehandhaafd, dient dit te worden vermeld en dient voorzichtigheid betracht te worden bij de interpretatie van de resultaten.

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten, indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen :

— gegevens over het testorganisme (wetenschappelijke naam; stam; leverancier of herkomst; eventuele voorbehandeling; kweekmethode — met inbegrip van de herkomst van het voer, de soort en hoeveelheid voer en de frequentie waarmee gevoerd is);

— herkomst van het verdunningswater alsmede de belangrijkste chemische kenmerken (bijvoorbeeld pH, temperatuur, hardheid);

— in geval van stoffen met een lage oplosbaarheid in water, de methode voor de bereiding van de stam- en testoplossingen;

— concentraties van eventuele hulpstoffen;

— lijst van de gebruikte concentraties en alle beschikbare gegevens over de stabiliteit bij de concentraties van de teststof in de gebruikte oplossingen;

— in geval van chemische analyses : toegepaste methoden en behaalde resultaten;

— de resultaten van de limiettest, indien van toepassing;

— beschrijving van de testuitrusting;

— lichtregime;

— de zuurstofgehalten, de pH-waarden en de temperaturen van de testoplossingen;

— gegevens om aan te tonen dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan;

— een tabel met de cumulatieve immobilisatie voor elke concentratie en voor de controlegroep (en, zo nodig, voor de controlegroep met hulpstof) op elke aanbevolen waarnemingstijd (24 en 48 uur);

— grafiek van de concentratie/responspercentage-kromme aan het einde van de test;

— zo mogelijk, de EC₅₀-waarden op elk van de aanbevolen waarnemingstijden (met de 95 % betrouwbaarheids grenzen);

— statistische procedures voor de bepaling van de EC₅₀-waarden;

- als een referentiestof wordt gebruikt moeten ook hiervan de resultaten worden vermeld;
- hoogste testconcentratie die binnen de testperiode geen immobilisatie veroorzaakte;
- laagste testconcentratie die binnen de testperiode 100 % immobilisatie veroorzaakte.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 202. Decision of the Council C(81) 30 Final and updates.
- (2) International Standard ISO, Water Quality—Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341 1989.
- (3) AFNOR. Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera—crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
- (4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).
- (6) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U. K.
- (7) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharmacol. Exper. Therap., 1949, vol. 96, 99-113.
- (8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
- (9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.
- (10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM 1977, STP 634, 65-84.
- (11) Stephan, C. E., Bush, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC₅₀. US EPA.

Aanhangsel 1

Synthetisch water

Voorbeeld van een geschikt verdunningswater (volgens ISO 6341)

Alle chemicaliën moeten van pro-analyse kwaliteit zijn.

Het water moet gedistilleerd of gedeïoniseerd water van goede kwaliteit zijn met een geleidingsvermogen van minder dan 5 µS cm⁻¹.

Het toestel voor de distillatie van water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Stamoplossingen

CaCl₂ · 2 H₂O calciumchloridedihydraat 11,76 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

MgSO₄ · 7 H₂O (magnesiumsulfaatheptahydraat) 4,93 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

NaHCO₃ (natriumwaterstofcarbonaat) 2,59 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

KCl (kaliumchloride) 0,23 g

Oplossen in water en aanvullen met water tot 1 liter.

Synthetisch verdunningswater

Meng 25 ml van elk van de vier stamoplossingen en vul met water aan tot 1 l.

Belucht tot het zuurstofgehalte overeenkomt met de verzadigingswaarde voor lucht.

De pH moet 7,8 ± 0,2 bedragen.

De pH zo nodig bijstellen met NaOH (natriumhydroxide) of HCl (zoutzuur).

Het aldus verkregen verdunningswater wordt gedurende ongeveer 12 uur weggezet en behoeft niet verder te worden belucht.

De som van de Ca- en Mg-ionen in deze oplossing bedraagt 2,5 mmol per liter. De verhouding van de Ca- en Mg-ionen is 4:1 en die van de Na- en K-ionen 10:1. De totale alkaliteit van deze oplossing is 0,8 mmol per liter.

Eventuele afwijkingen van de bereidingswijze van het verdunningswater mogen niet leiden tot een andere samenstelling of andere eigenschappen van het water.

Aanhangsel 2

Samenvatting van de resultaten van een EEG-ringtest, uitgevoerd in 1978 (ook aangehaald in referentie 2)

Let op: het doel van deze ringtest was de bepaling van de EC₅₀ na 24 uur.

Gebruikte stoffen:

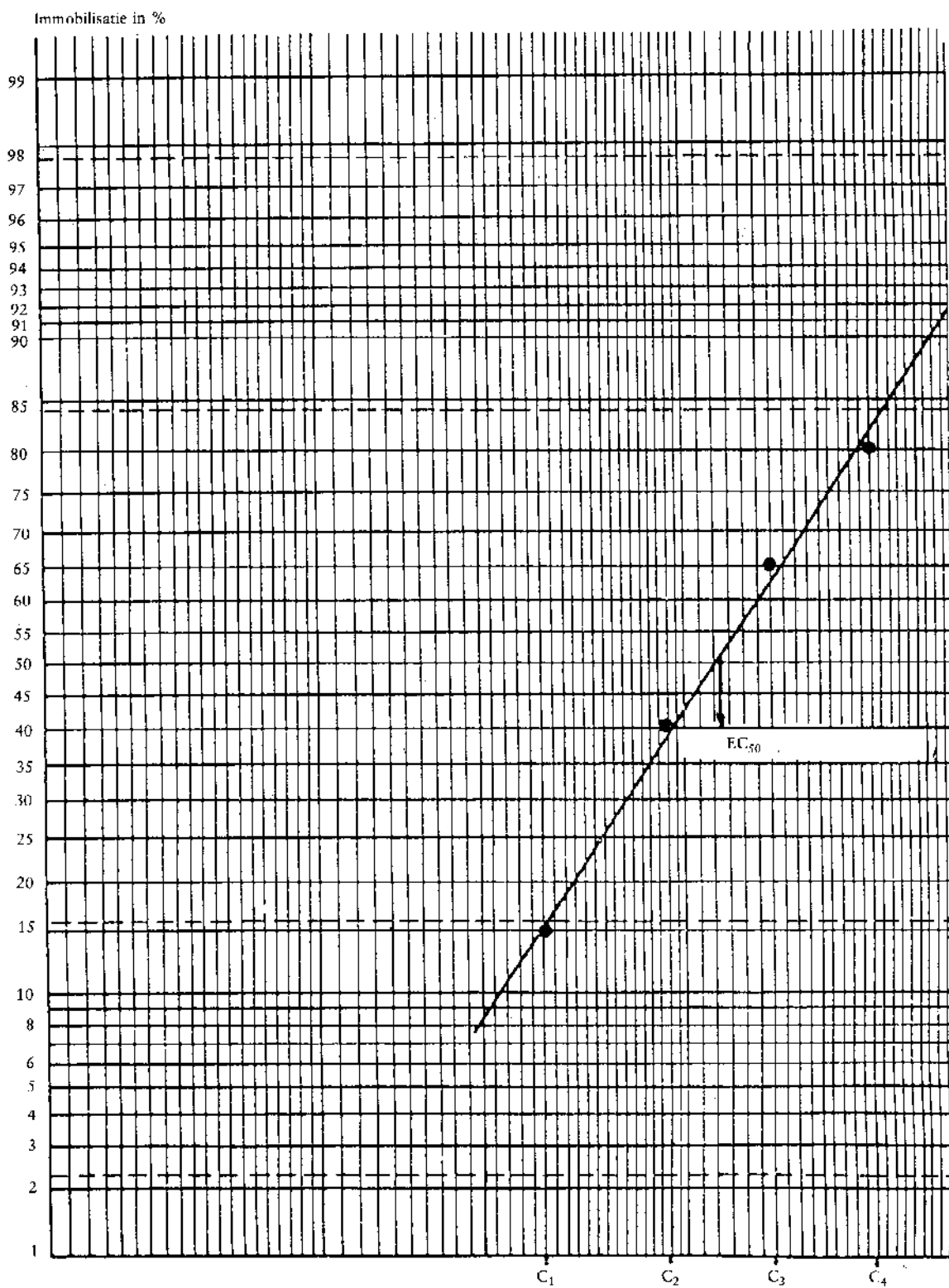
- 1) Kaliumdichromaat
- 2) Tetrapropylbenzeensulfonzuur
- 3) Tetrapropylbenzeensulfonzuur, natriumzout
- 4) 2,4,5-Trichloorfenoxiazijnzuur, kaliumzout

Stof	Aantal deelnemende laboratoria	Aantal resultaten voor de berekening	EC ₅₀ -24 uur mg/l gemiddelde
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Aanhangsel 3

Voorbeeld van concentratie/immobilisatiepercentage-curve

Voorbeeld van de bepaling van de FC_{50} -waarde met logaritmsch-waarschijnlijkheidspapier



C.3. GROEIREMMINGSTEST MET ALGEN

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van deze test is het bepalen van de effecten van een stof op de groei van een eencellige groene algensoort. Met relatief korte onderzoeken (72 uur) kunnen de effecten op verschillende generaties bepaald worden. Deze methode kan worden aangepast voor het gebruik met verschillende eencellige algensoorten; dan dient evenwel een beschrijving van de gebruikte methode bij het testrapport gevoegd te worden.

Deze test is eenvoudig toe te passen op in water oplosbare stoffen die, onder de testomstandigheden, waarschijnlijk in oplossing blijven.

De methode kan gebruikt worden voor stoffen die de meting van de algengroei niet direct storen.

Alvorens met de test te beginnen is het wenselijk om, voor zover mogelijk, te beschikken over gegevens over de oplosbaarheid in water, dampspanning, chemische stabiliteit, dissociatieconstanten en biologische afbreekbaarheid van de stof.

Zowel bij de voorbereiding van de test als bij de interpretatie van de resultaten moet rekening worden gehouden met nadere gegevens (bijvoorbeeld structuurformule, zuiverheidsgraad, aard en percentage van belangrijke verontreinigingen, aanwezigheid en hoeveelheid van additieven en de *n*-octanol/water-verdelingscoëfficiënt).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Celdichtheid : het aantal cellen per milliliter;

Groei : de toename van de celdichtheid gedurende de onderzoeksperiode;

Groeisnelheid : de toename van de celdichtheid per tijdseenheid;

EC₅₀ : in deze methode de concentratie van een teststof waarbij ten opzichte van de controle een 50 % vermindering van de groei (E_bC₅₀) of de groeisnelheid (E_rC₅₀) optreedt;

NOEC (no observed effect concentration, concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen) : in deze methode de hoogste geteste concentratie waarbij geen significante groeiremming wordt waargenomen ten opzichte van de controle;

Alle concentraties van de teststof worden opgegeven in gewicht per volume (mg/l). Ze kunnen ook worden uitgedrukt als gewicht per gewicht (mg kg⁻¹).

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Een referentiestof kan worden getest om aan te tonen dat de gevoeligheid van de geteste soort onder de testomstandigheden in het laboratorium niet in belangrijke mate is veranderd.

Als een referentiestof wordt gebruikt, moeten de resultaten worden weergegeven in het testrapport. Kaliumdichromaat mag als referentiestof gebruikt worden, maar de kleur zou van invloed kunnen zijn op de kwaliteit en intensiteit van het voor de cellen beschikbare licht, alsmede op de spectrometrische bepalingen indien deze gebruikt worden. Kaliumdichromaat is gebruikt tijdens een internationale inter-laboratoriumtest (zie referentie (3) en Aanhangsel 2).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Er kan een limiettest met 100 mg per liter worden uitgevoerd om aan te tonen dat de EC₅₀ hoger is dan deze concentratie.

Onder bepaalde omstandigheden worden exponentieel groeiende culturen van geselecteerde groene algen gedurende verschillende generaties blootgesteld aan verschillende concentraties van de teststof.

De testoplossingen worden geïncubeerd gedurende 72 uur en de celdichtheid wordt in iedere oplossing ten minste éénmaal per 24 uur gemeten. De remming van de groei wordt bepaald in verhouding tot een controlecultuur.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

De kwaliteitscriteria zijn zowel op de limiettest als op de volle studie toepasselijk.

De celdichtheid in de controleculturen moet binnen drie dagen ten minste met een factor 16 zijn toegenomen.

De concentratie van de teststof dient gedurende de gehele test binnen 80 % van de oorspronkelijke concentratie gehouden te worden.

Bij stoffen die gemakkelijk oplossen in het testmedium en stabiele oplossingen vormen en bijvoorbeeld niet in belangrijke mate vervluchtigen of worden afgebroken, gehydrolyseerd of geadsorbeerd, mag de beginconcentratie als gelijk aan de nominale concentratie beschouwd worden. Evenwel dient aangetoond te worden dat de concentraties gedurende de gehele test gehandhaafd werden en dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan.

Bij stoffen die :

(i) slecht oplosbaar zijn in het testmedium of

(ii) in staat zijn stabiele emulsies of dispersies te vormen of

(iii) niet stabiel zijn in waterige oplossingen

dient de bij het begin van de proef gemeten concentratie als de beginconcentratie te worden beschouwd. De concentratie dient te worden bepaald na een periode van evenwichtinstelling.

In al deze gevallen dienen gedurende de test verdere metingen te worden uitgevoerd om de actuele blootstellingsconcentraties te bevestigen of om te bevestigen dat aan de kwaliteitscriteria werd voldaan.

Zoals bekend kunnen significante hoeveelheden van de te onderzoeken stof tijdens de testperiode opgenomen in de biomassa van de algen. Om aan de bovengenoemde kwaliteitscriteria te voldoen dient daarom rekening gehouden te worden met zowel de hoeveelheid van de stof die is opgenomen in de algenbiomassa, als met de hoeveelheid stof in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, gemeten in de waterkolom). Daar de bepaling van de concentratie van de stof in de biomassa van de algen aanzienlijke technische problemen kan stellen, kan aangetoond worden dat aan de kwaliteitscriteria is voldaan door de proef bij de hoogste concentratie uit te voeren, maar dan zonder algen, en de concentraties aan het begin en het einde van de proef in de oplossing (of, indien dit technisch onmogelijk is, in de waterkolom) te meten.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Oplossingen van de teststoffen

Stamoplossingen van de gewenste sterkte worden bereid door de stof op te lossen in gedeïoniseerd water of water volgens 1.6.1.2.

De gekozen testconcentraties worden bereid door geschikte hoeveelheden aan de algen-voorcultuur toe te voegen (zie Aanhangsel 1). Stoffen moeten normaal gezien enkel worden getest tot aan de oplosbaarheidsgrens. Bij sommige stoffen (bijvoorbeeld stoffen met lage oplosbaarheid in water of een hoge P_{ow}) of stoffen die een stabiele dispersie vormen in plaats van een echte oplossing in water), is het aanvaardbaar een testconcentratie te onderzoeken boven de oplosbaarheidsgrens van de stof, om te verzekeren dat de maximaal oplosbare/stabiele concentratie werd bereikt. Het is echter belangrijk dat deze concentratie niet op andere wijze het testsysteem verstoort (bijvoorbeeld een vlies van de stof op het water waardoor de zuurstofvoorziening van het water wordt verhinderd, enz.).

Ultrasonische dispersie, organische oplosmiddelen, emulgatoren of dispergeermiddelen kunnen worden gebruikt als hulpmiddel bij het bereiden van stamoplossingen van stoffen met een lage oplosbaarheid in water of bij het dispergeren van deze stoffen in het testmedium. Indien dergelijke hulpstoffen worden gebruikt, moeten alle testconcentraties dezelfde hoeveelheid hulpstof bevatten moeten extra controles worden blootgesteld aan dezelfde concentratie van de hulpstof als die welke is gebruikt in de testreeks. De concentratie van dergelijke hulpstoffen dient zo laag mogelijk gehouden te worden en mag in géén geval groter zijn dan 100 mg per liter testmedium.

De test dient te worden uitgevoerd zonder correctie van de pH. Indien er aanwijzingen zijn voor een duidelijke verandering van de pH, wordt aangeraden om de test te herhalen na correctie van de pH en de resultaten te vermelden. In dat geval dient de pH-waarde van de stamoplossing te worden aangepast aan de pH-waarde van het verdunningswater, tenzij er speciale redenen zijn om dit niet te doen. Voor dit doel verdienen HCl en NaOH de voorkeur. Deze pH-correctie dient zodanig te geschieden dat de concentratie van de teststof in de stamoplossing niet in belangrijke mate wordt gewijzigd. Indien tengevolge van de correctie een chemische reactie of fysische neerslagvorming van de teststof mocht optreden, dan dient dit te worden vermeld.

1.6.1.2. Testmedium

Het water dient gedistilleerd water van goede kwaliteit te zijn, of gedeïoniseerd water met een soortelijke geleiding van minder dan $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Het toestel voor de distillatie van het water mag geen koperen onderdelen bevatten.

Het volgende medium wordt aangeraden.

Vier stamoplossingen worden bereid volgens de volgende tabel. De stamoplossingen worden gesteriliseerd met behulp van membraanfiltratie of een autoclaaf en opgeslagen in het donker bij 4°C . Stamoplossing nr. 4 mag alleen met membraanfiltratie gesteriliseerd worden. Deze stamoplossingen worden verdund om de eindconcentraties van voedingsstoffen in de testoplossingen te bereiken.

Voedingsstoffen	Concentratie in de stamoplossing		Eindconcentratie in de testoplossing	
Stamoplossing 1: Macro-voedingsstoffen				
NH_4Cl	1,5	g/l	15	mg/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2	g/l	12	mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8	g/l	18	mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5	g/l	15	mg/l
KH_2PO_4	0,16	g/l	1,6	mg/l
Stamoplossing 2: Fe-EDTA				
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/l		0,08 mg/l	
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l		0,1 mg/l	
Stamoplossing 3: Sporelementen				
H_3BO_3	185	mg/l	0,185	mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415	mg/l	0,415	mg/l
ZnCl_2	3	mg/l	3×10^{-3}	mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5	mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01	mg/l	10^{-5}	mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7	mg/l	7×10^{-3}	mg/l
Stamoplossing 4: NaHCO_3				
NaHCO_3	50	g/l	50	mg/l

De pH van het medium na bereiken van een evenwichtstoestand met lucht is ongeveer 8.

1.6.2. Apparatuur

— Gangbare laboratoriumuitrusting.

— Testkolven met een geschikt volume (erlenmeyers van 250 ml zijn bijvoorbeeld geschikt indien het volume van de testoplossing 100 ml bedraagt). Alle testkolven dienen identiek te zijn wat betreft materiaal en dimensies.

— Kweekapparaat: kast of kamer waarin de temperatuur binnen het bereik van 21 tot 25°C , binnen $\pm 2^\circ\text{C}$ gehouden kan worden, en een continue uniforme verlichting in het spectraal bereik van 400 tot 700 nm. Indien de algen in de controleculturen de vereiste groeisnelheid hebben bereikt, mag aangenomen worden dat de groeivoorwaarden, inclusief de lichtintensiteit, voldoende waren.

Het verdient aanbeveling op het gemiddelde niveau van de testoplossingen een lichtintensiteit tussen 60 en 120 $\mu\text{E. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (35 tot 70 $\times 10^{18}$ fotonen. $\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) te gebruiken, gemeten in het bereik van 400 tot 700 nm met behulp van een geschikte receptor. Voor lichtmeters die geijkt zijn in lux is een gelijkwaardig bereik van 6 000 tot 10 000 lux aanvaardbaar.

Deze lichtintensiteit kan verkregen worden met behulp van vier tot zeven 30 W TL-lampen van het universele witte type (kleurtemperatuur ongeveer 4 000 K) op 0,35 m afstand van de algencultuur.

— Celdichtheidsmetingen moeten uitgevoerd worden met een rechtstreekse telling voor levende cellen, bijvoorbeeld een microscoop met telkamers. Andere methoden (fotometrie, turbidimetrie...) kunnen gebruikt worden indien zij voldoende gevoelig zijn en indien is aangetoond dat zij voldoende goed gecorreleerd zijn met de celdichtheid.

1.6.3. Testorganismen

Het verdient aanbeveling om als groene algensoort een snelgroeiend soort te nemen dat geschikt is voor kweken en testen. De volgende soorten hebben de voorkeur :

— *Selenastrum capricornutum*, bijvoorbeeld ATCC 22662 of CCAP 278/4,

— *Scenedesmus subspicatus*, bijvoorbeeld 86.81 SAG.

Opmerking :

ATCC = American Type Culture Collection (V.S.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (G.B.)

SAG = Algencultuur-verzameling (Göttingen, B.R.D.)

Indien andere soorten worden gebruikt, dient de stam te worden vermeld.

1.6.4. Testprocedure

Het concentratiebereik waarin het optreden van de effecten wordt verwacht, kan bepaald worden met behulp van proeven voor afbakening van het testbereik.

De twee meeteenheden voor groei (biomassa en groeisnelheid) kunnen resulteren in zeer uiteenlopende maten van groeiremming; beide dienen gebruikt te worden in de afbakingsproef om er zeker van te zijn dat de meetkundige concentratiereeks een schatting van de $E_b C_{50}$ en de $E_r C_{50}$ mogelijk maakt.

Oorspronkelijke celdichtheid

Het verdient aanbeveling dat de celdichtheid in de testculturen voor *Selenastrum capricornutum* en *Scenedesmus subspicatus* in het begin ongeveer 10^4 cellen/ml bedraagt. Indien andere soorten worden gebruikt dient de biomassa vergelijkbaar te zijn.

Concentraties van de teststof

Ten minste vijf testconcentraties worden zo bereid dat ze een meetkundige reeks vormen, met een concentratie-verhouding die niet groter is dan 2,2. De laagste geteste concentratie mag geen waarneembaar effect op de algengroei vertonen. De hoogste geteste concentratie dient de groei ten opzichte van de controle met ten minste 50 % te remmen en bij voorkeur de groei volledig te stoppen.

Duplo's en controles

Elke testconcentratie dient in triplo getest te worden. Drie controles zonder teststof dienen te worden uitgevoerd en indien van toepassing tevens drie controles met hulpstof. Indien gemotiveerd mag het testschema veranderd worden om het aantal concentraties op te voeren en het aantal duplo's per concentratie te verminderen.

Uitvoering van de test

Testculturen met de gewenste concentraties teststof en de gewenste hoeveelheid algen-inoculum worden bereid door toevoeging van hoeveelheden van de stamoplossing van de teststof aan de vereiste hoeveelheden preculturen van de algen (zie Aanhangsel 1).

De testkolven worden geschud en in het kweekapparaat geplaatst. De algen worden in suspensie gehouden door schudden, roeren of doorborrelen met lucht om aldus de gasuitwisseling te verbeteren en de pH-variëte in de testoplossing te verminderen. De culturen moeten op een temperatuur van 21 tot 25 °C worden gehouden, afgeregeld tot op ± 2 °C.

De celdichtheid in iedere kolf wordt ten minste 24, 48, en 72 uur na de start van de test bepaald. Gefilterd algen-medium met de juiste concentratie van de teststof wordt gebruikt als achtergrondbepaling, indien gebruik wordt gemaakt van andere methoden voor meting van de celdichtheid dan rechtstreekse telling.

De pH wordt aan het begin van de test en na 72 uur gemeten.

De pH van de controles mag tijdens de test niet meer dan 1,5 eenheid variëren.

Testen van vluchtige stoffen

Tot op heden bestaat er geen algemeen aanvaarde methode voor het testen van vluchtige stoffen. Indien van een stof bekend is dat ze neiging heeft tot verdampen, kunnen gesloten kolven met een vergrote vrije ruimte boven de vloeistof gebruikt worden. Er dient evenwel bij het berekenen van de vrije ruimte in de gesloten kolven rekening gehouden te worden met een mogelijk CO_2 -gebrek. Variaties op deze methode zijn voorgesteld (zie referentie (4)).

Getracht moet worden om de hoeveelheid stof te bepalen die in de oplossing blijft en aanbevolen wordt om extra voorzichtig te zijn bij het interpreteren van resultaten van tests met vluchtige chemicaliën met behulp van gesloten systemen.

Limiettest

Met de procedure beschreven in deze methode kan een limiettest worden uitgevoerd met 100 mg per liter om aan te tonen dat de EC_{50} hoger is dan deze concentratie.

Indien de aard van de stof zodanig is dat een concentratie van 100 mg per liter in het testwater niet bereikt kan worden, dient de proef te worden uitgevoerd bij een concentratie die gelijk is aan de oplosbaarheid van de te onderzoeken stof (of de maximale concentratie die een stabiele dispersie vormt) in het gebruikte medium (zie ook punt 1.6.1.1).

De limiettest dient ten minste in drievoud te worden uitgevoerd met hetzelfde aantal controles. De twee groei-eenheden (biomassa en groeisnelheid) dienen bij de limiettest gebruikt te worden.

Indien in een limiettest een gemiddelde afname van de biomassa of de groeisnelheid ten opzichte van de controle van 25 % of meer wordt gevonden, dient een volledige studie te worden uitgevoerd.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

De in de testculturen en controles gemeten celdichtheid wordt in tabellen genoteerd met de concentraties van de teststof en de tijdstippen van de meting. De gemiddelde waarde van de celdichtheid voor iedere concentratie van de teststof en de controles wordt uitgezet als functie van de tijd (0-72 uur) om aldus groeikrommes te verkrijgen.

Om de concentratie/effect verhouding te bepalen dienen de twee volgende benaderingen te worden gevolgd. Bepaalde stoffen kunnen de groei stimuleren bij lage concentraties. Alleen met gegevens die op een remming tussen 0 en 100 % wijzen, moet rekening gehouden worden.

2.1. VERGELIJKING VAN DE OPPERVLAKTEN ONDER DE GROEIKROMMES

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

waarin

A = de oppervlakte,

N_0 = het aantal cellen/ml op tijd t_0 (begin van de test),

N_1 = het gemeten aantal cellen/ml op tijd t_1 ,

N_2 = het gemeten aantal cellen/ml op tijd t_n ,

t_1 = het tijdstip van de eerste meting na het begin van de test,

t_n = het tijdstip van de nde meting na het begin van de test,

n = het aantal uitgevoerde metingen sinds het begin van de test.

Het percentage celgroeiremming bij iedere teststofconcentratie (I_A) wordt berekend volgens de formule:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

waarin

A_c = de oppervlakte tussen de groeikromme voor de controle en de horizontale lijn $N = N_0$,

A_t = de oppervlakte tussen de groeikromme bij concentratie t en de horizontale lijn $N = N_0$.

I_A -waarden worden uitgezet tegen de bijbehorende concentraties op semilogaritmisch papier of op semilogaritmisch waarschijnlijkheidspapier. Indien uitgezet op waarschijnlijkheidspapier, dienen de punten op het oog, of met behulp van een berekende regressie te worden verbonden door een rechte lijn.

De EC_{50} wordt geschat op grond van de regressielijn door de concentratie af te lezen die overeenkomt met 50 % remming ($I_A = 50$ %). Om de met deze methode verkregen waarde ondubbelzinnig te onderscheiden, wordt voorgesteld om het symbool E_bC_{50} te gebruiken. Het is van wezenlijk belang om de E_bC_{50} aan te geven met de betrokken blootstellingsperiode, bijvoorbeeld E_bC_{50} (0-72 uur).

VERGELIJKING VAN DE GROEISNELHEID

De gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) voor exponentieel groeiende culturen kan als volgt berekend worden:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

waarin t_0 de tijd aan het begin van de test is.

De gemiddelde specifieke groeisnelheid kan anderszins worden afgeleid uit de helling van de regressielijn, verkregen door $\ln N$ uit te zetten tegen de tijd.

Het percentage remming van de specifieke groeisnelheid bij iedere teststofconcentratie ($I_{\mu t}$) wordt berekend volgens de formule:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

waarin

μ_c = de gemiddelde specifieke groeisnelheid

μ_t = de gemiddelde specifieke groeisnelheid voor de testconcentratie t

De oppervlakte tussen de groeikrommes en de horizontale lijn $N = N_0$ kan berekend worden volgens de formule :

De percentuele afname van de gemiddelde specifieke groeisnelheid bij iedere teststofconcentratie ten opzichte van de controlewaarde wordt uitgezet tegen de logaritme van de concentratie. De EC_{50} kan vervolgens afgelezen worden uit de verkregen grafiek. Om de met deze methode verkregen EC_{50} -waarde ondubbelzinnig te onderscheiden, wordt voorgesteld om het symbool $E_r C_{50}$ te gebruiken. Het tijdstip van de meting dient te worden aangegeven; als de waarde bij de tijdstippen 0 en 72 uur behoort, wordt bijvoorbeeld het symbool als $E_r C_{50}(0-72 \text{ uur})$ aangegeven.

Opmerking : De specifieke groeisnelheid is een logaritmische term, zodat kleine veranderingen in de groeisnelheid kunnen leiden tot grote veranderingen in de biomassa. De $E_b C$ - en $E_r C$ -waarden zijn daarom niet numeriek vergelijkbaar.

2.3. BEREKENING VAN DE NOEC

De concentratie waarbij geen effect wordt waargenomen (NOEC) wordt bepaald volgens een geschikte statistische procedure voor meervoudige monstervergelijking (bijvoorbeeld variantie-analyse en Dunnett-test), met behulp van de uit de triplo-tests verkregen afzonderlijke waarden van de oppervlakten onder de groeikrommes A (zie punt 2.1), of de specifieke groeisnelheden μ (zie 2.2).

3. RAPPORTAGE

In het verslag moeten indien mogelijk de volgende gegevens worden opgenomen :

- teststof : gegevens voor chemische identificatie;
- gegevens over het testorganisme : oorsprong, laboratoriumcultuur, stamnummer, kweekmethode;
- testomstandigheden :
- datum van het begin en het einde van de test, alsmede de duur;
- temperatuur;
- samenstelling van het medium;
- kweekapparatuur;
- pH van de oplossingen aan het begin en het einde van de test (een verklaring dient gegeven te worden als pH-veranderingen van meer dan 1,5 eenheid werden waargenomen);
- medium en de gebruikte methode voor het oplossen van de teststof en de concentratie van het medium in de testoplossing;
- lichtintensiteit en -kwaliteit;
- geteste concentraties (gemeten of nominaal);
- resultaten :
- celdichtheid in iedere kolf op ieder meetpunt en de methode voor het bepalen van de celdichtheid;
- gemiddelde waarden van de celdichtheid;
- groeikrommes;
- grafische presentatie van de concentratie/effect relatie;
- EC-waarden en de berekeningsmethode;
- NOEC;
- andere waargenomen effecten.

4. LITERATUUR

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201. Decision of the Council C(81) 30 Fmal.
- (2) Umweltbundesamt, Berlijn, 1984, Verfahrensvorschlag « Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus* », in : Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg 1986.
- (3) ISO 8692—Water Quality—Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi en M. Vighi—Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123-1126.

Aanhangsel I

Voorbeeld van een procedure voor het kweken van algen

Algemene observaties

Het doel van het kweken op basis van de volgende procedure is het verkrijgen van algenculturen voor toxiciteitstesten.

Geschikte methoden moeten gebruikt worden om te verzekeren dat de algenculturen niet besmet worden met bacteriën (ISO 4833). Axenische culturen zijn gewenst, maar eensoortige algenculturen zijn verplicht.

Alle behandelingen dienen te worden uitgevoerd onder steriele omstandigheden ter vermijding van besmetting met bacteriën of andere algen. Besmette culturen dienen te worden afgekeurd.

Procedure voor het verkrijgen van algenculturen

Bereiding van de voedingsstoffenoplossingen (media) :

Het medium kan bereid worden door verdunnen van de geconcentreerde stamoplossingen van voedingsstoffen. Voor vast medium wordt 0,8 % agar toegevoegd. Het medium moet steriel zijn. Sterilisatie met een autoclaaf kan leiden tot verlies van NH_3 .

Stamculturen :

De stamculturen bestaan uit kleine algenculturen die regelmatig op vers medium worden overgezet om aldus als nieuw uitgangsmateriaal voor tests te dienen. Indien de culturen niet regelmatig worden gebruikt, worden zij uitgestreken in schuine agarbuizen. Deze worden ten minste éénmaal per twee maanden overgebracht op vers medium.

De stamculturen worden gekweekt in erlenmeyers met het geschikte medium (volume ongeveer 100 ml). Wanneer de algen geïncubeerd worden bij 20 °C met continue verlichting, is wekelijks overzetten vereist.

Gedurende het overzetten wordt een hoeveelheid „oud” medium met steriele pipetten zodanig overgebracht naar de kolf met het verse medium, dat de beginconcentratie van de snelgroeïende soort ongeveer 100 maal kleiner is dan in de oude cultuur.

De groeisnelheid kan bepaald worden uit de groeikromme. Indien bekend, is het mogelijk de dichtheid te schatten waarbij de cultuur moet worden overgezet naar het nieuwe medium. Dit dient te geschieden voordat de cultuur de afstervingsfase bereikt.

Voorcultuur :

De voorcultuur dient om een aantal algen te geven dat geschikt is voor inoculatie van de testculturen. De voorculturen worden geïncubeerd onder testomstandigheden en worden gebruikt terwijl zij nog exponentieel groeien, normaal gezien na een incubatieperiode van drie dagen. Wanneer de algenculturen misvormde of abnormale cellen bevatten, moeten ze worden afgekeurd.

Aanhangsel 2

In ISO 8692 ("Water Quality—Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*") worden de volgende resultaten vermeld voor een interlaboratoriumtest, uitgevoerd door 16 laboratoria, met kaliumdichromaat als teststof :

	Gemiddelde (mg/l)	Bereik (mg/l)
E_rC_{50} (0-72 h)	0,84	0,60 tot 1,03
E_bC_{50} (0-72 h)	0,53	0,20 tot 0,75

C.4. BEPALING VAN DE GEMAKKELIJKE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

DEEL I. ALGEMEEN

I.1. INLEIDING

Voor het testen van de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid van chemische stoffen in een aëroob watermedium worden zes testmethoden beschreven :

- (a) DOC (opgeloste organische koolstof) Afvlakkingstest (Methode C.4-A)
- (b) Gewijzigde OESO-Screening test — Afvlakking DOC (Methode C.4-B)
- (c) Kooldioxyde (CO₂) Ontwikkelingstest (Gewijzigde Sturm-test) (Methode C.4-C)
- (d) Manometrische respirometrie (Methode C.4-D)
- (e) Gesloten-flestest (Methode C.4-E)
- (f) MITI (Ministerie voor Internationale Handel en Industrie — Japan) (Methode C.4-F)

In deel I van de methode worden zowel de algemene aanwijzingen als de op alle zes tests betrekking hebbende aanwijzingen gegeven. In de Delen II tot en met VII worden bijzonderheden over de afzonderlijke methoden vermeld. De bijlagen bevatten definities, formules en nadere toelichting.

Bij een vergelijkend onderzoek tussen laboratoria in OESO-verband in 1988 bleek dat de methoden overeenstemmende resultaten geven. Afhankelijk van de fysische kenmerken van de te onderzoeken stof kan echter de voorkeur naar de ene of de andere methode gaan.

I.2. KEUZE VAN DE GESCHIKTE METHODE

Voor een keuze van de meest in aanmerking komende methode is informatie over de oplosbaarheid, de dampdruk en de adsorptie-eigenschappen van de stof van wezenlijk belang. Voor het berekenen van theoretische waarden en/of het controleren van gemeten waarden voor parameters, b.v. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (zie Bijlagen I en II) moet de scheikundige structuur of de brutoformule bekend zijn.

Teststoffen die tot ten minste 100 mg/l in water oplosbaar zijn kunnen met alle methoden worden bepaald, mits ze niet-vluchtig en niet-adsorberend zijn. Voor stoffen die slecht in water oplosbaar, vluchtig of adsorberend zijn, worden in Tabel 1 geschikte methoden aangegeven. De wijze waarop slecht in water oplosbare stoffen en vluchtige stoffen kunnen worden behandeld wordt beschreven in Bijlage III. Matig vluchtige stoffen kunnen worden onderzocht met behulp van de DOC-afvlakkingmethode, indien er voldoende gasruimte in de proefvaten is (deze zouden goed afgesloten moeten worden). In dat geval dient een niet-biologische controle te worden toegepast voor het verdisconteren van een eventueel fysisch verlies.

Tabel 1: Bruikbaarheid van testmethoden

Test	Analytische methode	Geschiktheid voor de volgende stoffen:		
		Slecht oplosbaar	Vluchtig	Adsorberend
DOC Afvlakking	Opgeloste organische koolstof	—	—	+ / -
Gew. OESO Afvlakking	Opgeloste organische koolstof	—	—	+ / -
Ontwikkeling CO ₂	Respirometric: CO ₂ -ontwikkeling	+	—	+
Manometrische respirometrie	Manometrische respirometrie: zuurstofverbruik	+	+ / -	+
Gesloten fles	Respirometrie: opgeloste zuurstof	+ / -	+	+
MITI	Respirometrie: zuurstofverbruik	+	+ / -	+

Informatie over de zuiverheid of de relatieve hoeveelheden van belangrijke componenten van het testmateriaal is nodig voor een interpretatie van de verkregen resultaten, vooral wanneer de uitkomsten gering of marginaal zijn.

Informatie over de giftigheid van de teststof voor bacteriën (Bijlage IV) kan zeer nuttig zijn voor het kiezen van de juiste testconcentraties en kan essentieel zijn voor een juiste interpretatie van een geringe waarde voor de biologische afbraak.

I.3. REFERENTIESTOFFEN

Voor een controle op de procedure worden referentiestoffen die aan de criteria voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid voldoen onderzocht door een geschikte proefvolume referentiestof parallel met de gewone testuitvoeringen te behandelen.

Geschikte chemische stoffen zijn aniline (vers gedistilleerd), natriumacetaat en natriumbenzoaat. Deze referentiestoffen worden bij de onderhavige methoden alle afgebroken, zelfs wanneer niet bewust entmateriaal wordt toegevoegd.

Voorgesteld is een referentiestof te zoeken die wel gemakkelijk biologisch afbreekbaar is maar de toevoeging van een entmateriaal vereist. Daartoe is kaliumwaterstoftalaat voorgesteld, maar de geschiktheid moet nog worden aangetoond voordat deze stof als referentiestof aangenomen kan worden.

In de respirometrische testen kunnen stikstof bevattende verbindingen als gevolg van nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

I.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODEN

Een oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium wordt geënt en onder aërobe omstandigheden in het donker of in gedempt licht bebroed. De hoeveelheid DOC in de testoplossing die het gevolg is van het entmateriaal dient zo laag mogelijk te zijn in vergelijking met de hoeveelheid DOC tengevolge van de teststof.

Voor de endogene activiteit van het entmateriaal wordt een correctie aangebracht door middel van parallelle blanco proeven met entmateriaal maar zonder teststof, ofschoon de endogene activiteit van cellen in aanwezigheid van een teststof niet volledig overeenstemt met die van de endogene controle. De werking van de procedures wordt gecontroleerd door een parallelle test met een referentiestof uit te voeren.

In het algemeen wordt de afbraak gevolgd door de bepaling van parameters, zoals DOC, CO₂-productie en opgenomen zuurstof en worden op voldoende frequente tijdstippen metingen gedaan om het begin en het einde van de biologische afbraak vast te stellen. Bij automatische respirometers is de meting continu. Soms wordt de DOC gemeten naast een andere parameter, maar gewoonlijk wordt dit slechts bij het begin en bij de afloop van de test gedaan. Voor het bepalen van de primaire afbraak van de teststof en voor het bepalen van de concentratie van eventuele gevormde tussenproducten (verplicht bij de MITI-test) kan ook een specifieke chemische analyse worden uitgevoerd.

Gewoonlijk duurt de test 28 dagen. De proeven kunnen echter ook eerder dan na 28 dagen, en wel zodra de kromme voor de biologische afbraak gedurende ten minste 3 bepalingen een plateau vertoont, worden beëindigd. De proeven kunnen ook langer dan 28 dagen worden voortgezet, wanneer uit de kromme blijkt dat de biologische afbraak wel begonnen is, maar dat op dag 28 nog geen plateau is bereikt.

I.5. KWALITEITSCRITERIA

I.5.1. Reproduceerbaarheid

In verband met de aard van de biologische afbraak en van de als entmateriaal gebruikte gemengde bacterie-populaties dienen bepalingen ten minste in tweevoud te worden uitgevoerd.

De ervaring leert in het algemeen dat hoe hoger de aanvankelijk aan het testmedium toegevoegde concentratie micro-organismen is, hoe geringer de afwijking tussen herhaalde bepalingen is. Uit ringtests is ook gebleken dat er tussen de resultaten van verschillende laboratoria grote verschillen kunnen zijn, maar gewoonlijk wordt met gemakkelijk biologische afbreekbare stoffen een goede overeenstemming verkregen.

I.5.2. Geldigheid van de test

Een test wordt geldig beschouwd indien het verschil tussen de uiterste waarden van de in de test meermalen uitgevoerde metingen van de verwijdering van teststof op het plateau-niveau, aan het einde van de test of aan het einde van het venster van 10 dagen, minder is dan 20 % en indien het percentage afbraak van de referentiestof na 14 dagen het niveau voor gemakkelijke biologische afbreekbaarheid heeft bereikt. Indien aan een van deze voorwaarden niet is voldaan, dient de test te worden herhaald. Wegens de strengheid van de methoden behoeven lage waarden nog niet te betekenen dat de teststof onder milieu-omstandigheden niet biologisch afbreekbaar is, maar wel dat meer onderzoek nodig is om de biologische afbreekbaarheid vast te stellen.

Indien in een toxiciteitstest waarbij zowel de teststof als een referentiestof aanwezig is, in 14 dagen minder dan 35 % afbraak (gebaseerd op DOC) of minder dan 25 % afbraak (gebaseerd op ThOD of ThCO₂) is opgetreden, kan worden aangenomen dat de teststoffen remmend werken (zie ook Bijlage IV). De testreeks dient dan te worden herhaald, zo mogelijk met een lagere concentratie teststof en/of een hogere concentratie entmateriaal, maar niet meer dan 30 mg vaste stof per liter.

1.6. ALGEMENE WERKWIJZEN EN BEREIDINGEN

Algemene omstandigheden die van toepassing zijn op de test zijn in Tabel 2 samengevat. Apparatuur en overige experimentele omstandigheden die op afzonderlijke tests betrekking hebben worden verderop in het hoofdstuk voor die test beschreven.

Tabel 2: Testomstandigheden

Test	DOC Afvlakking	CO ₂ -ontwikkeling	Manometrische respirometrie	Gewijzigde OECD-test	Gesloten fles	MITI (I)
Concentratie teststof als in mg/l mg DOC/l mg ThOD/l	10-40	10-20	100 10-40 50-100		2-10 5-10	100
Concentratie entmateriaal (in cellen/l, bij benadering)	≤ 30 mg/l SS of ≤ 100 ml effluent/l (10 ⁷ - 10 ⁸)			0,5 ml secundair effluent/l (10 ⁵)	≤ 5 ml effluent/l (10 ⁴ - 10 ⁶)	30 mg/l SS (10 ⁷ - 10 ⁸)
Concentratie elementen in anorganisch medium (in mg/l):						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05-0,1				0,05-0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					bij voorkeur 7,0
Temperatuur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = opgeloste organische koolstof		ThOD = theoretisch zuurstofverbruik		SS = gesuspendeerde vaste stof		

I.6.1. Verdunningswater

Gedeïoniseerd of gedistilleerd water, dat vrij is van remmende concentraties giftige stoffen (b.v. Cu⁺⁺-ionen) wordt gebruikt. Het mag niet meer dan 10 % van de hoeveelheid organische koolstof die met het testmateriaal wordt geïntroduceerd bevatten. De grote zuiverheid van het testwater is nodig om hoge waarden van de blanco-proeven te vermijden. Besmetting kan het gevolg zijn van aanwezige verontreinigingen en ook van de ionenuitwisselende harsen en van de lysis van bacteriën en algen. Voor elke reeks tests dient slechts gebruik te worden gemaakt van een enkele voorraad water, die vooraf door middel van DOC-analyse is gecontroleerd. Zo'n controle is niet nodig voor de gesloten fles-test, maar het zuurstofverbruik van het water moet laag blijven.

I.6.2. Voorraadoplossingen van anorganische componenten

Voor het bereiden van testoplossingen worden voorraadoplossingen met geschikte concentraties van anorganische componenten aangemaakt. Voor de methoden DOC-afvlakking, gewijzigde OESO-test, CO₂-ontwikkeling, manometrische respirometrie en gesloten fles kunnen de onderstaande voorraadoplossingen worden gebruikt (met verschillende verdunningsfactoren).

De verdunningsfactoren en, voor de MITI-test, de specifieke bereiding van het anorganische medium, worden in de hoofdstukken van de afzonderlijke tests beschreven.

Voorraadoplossingen :

De onderstaande voorraadoplossingen worden bereid met gebruikmaking van reagentia van analytische kwaliteit.

(a)	Monokaliumdiwaterstoforthosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonowaterstoforthosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonowaterstoforthosfaat-dihydraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	33,40 g
	Ammoniumchloride, NH_4Cl	0,50 g

Oplossen in water en tot 1 liter aanvullen. De pH van de oplossing moet 7,4 zijn.

(b)	Calciumchloride, watervrij, CaCl_2	27,50 g
	of calciumchloride-dihydraat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36,40 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	

(c)	Magnesiumsulfaat-heptahydraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	

(d)	IJzer(III)chloride-hexahydraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	In water oplossen en tot 1 liter aanvullen	

Opmerking: Teneinde deze oplossing (d) niet onmiddellijk voor gebruik te behoeven te bereiden wordt één druppel geconcentreerde HCl of 0,4 g ethyleendiaminetetra-azijnzuur-dinatriumzout (EDTA) per liter toegevoegd.

1.6.3. Voorraadoplossingen van chemicaliën

Indien de oplosbaarheid meer dan 1 g/l bedraagt, wordt bijvoorbeeld 1-10 g, zoals toepasselijk is, aan teststof of referentiestof in gedeïoniseerd water opgelost en tot 1 liter aangevuld. In andere gevallen worden voorraadoplossingen in het anorganische medium bereid of wordt de stof rechtstreeks aan het anorganische medium toegevoegd. Voor het bewerken van minder goed oplosbare stoffen wordt verwezen naar Bijlage III, maar in de MITI-test (Methode C.4-F) dienen noch oplosmiddelen noch emulgatoren te worden gebruikt.

1.6.4. Entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn : actief slib, (chloorvrij) behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan. Indien bij de DOC-afvlakking, de CO_2 -ontwikkeling en de manometrische respirometrie actief slib wordt gebruikt, dient dit te worden onttrokken aan een behandelingsinstallatie of installatie op laboratoriumschaal die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater verwerkt. Gebleken is dat entmateriaal van andere bronnen een grotere spreiding van resultaten geeft. Voor de gewijzigde OESO-test en de gesloten-fleestest is een meer verdund entmateriaal zonder slibvlokken nodig en bij voorkeur wordt dan als bron een secundair effluent van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of van een laboratoriuminstallatie met huishoudelijk afvalwater genomen. Voor de MITI-test is het entmateriaal afkomstig van een mengsel van bronnen. Het wordt in het hoofdstuk van die test beschreven.

1.6.4.1. Entmateriaal uit actief slib

Uit de beluchtingstank van een rioolwaterzuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afval verwerkt, wordt een vers monster actief slib verzameld. Grove deeltjes worden zonodig door filtratie door een fijne zeef verwijderd; daarna wordt het slib aëroob gehouden.

In plaats daarvan kan na verwijdering van eventuele grove deeltjes worden bezonken of gecentrifugeerd (b.v. 10 min. bij 1 100 g). De bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen. Het geconcentreerde slib kan in het mineraal medium gewassen worden; daarna wordt het in anorganisch medium gesuspenderd tot een concentratie van 3-5 g gesuspenderde vaste stof/l en belucht tot het tijdstip van gebruik.

Slib moet afkomstig zijn van een correct werkend zuiveringsstation. Als slib afkomstig is van een installatie met hoge omloopsnelheid, of geacht wordt remmers te bevatten, dient het te worden gewassen. Het opnieuw gesuspenderde slib wordt na grondig mengen bezonken of gecentrifugeerd, de bovenstaande vloeistof wordt weggeworpen en het gewassen slib wordt in een volgend volume anorganisch medium opnieuw gesuspenderd. Deze procedure wordt herhaald totdat het slib geacht wordt vrij te zijn van overmaat substraat of remmer.

Nadat het slib volledig opnieuw is gesuspenderd, of bij niet behandeld slib direct, wordt vlak voor gebruik een monster getrokken voor de bepaling van het droog gewicht aan gesuspenderde vaste stoffen.

Een andere mogelijkheid is het homogeniseren van actief slib (3-5 g gesuspenderde vaste stof per l). Het slib wordt 2 min. bij matige snelheid in een mechanische menger behandeld. Het gemengde slib wordt gedurende 30 min. of zoveel langer als nodig bezonken en de vloeistof wordt afgeschonken en gebruikt als entmateriaal in een hoeveelheid van 10 ml/l anorganisch medium.

1.6.4.2. Andere bronnen van entmateriaal

Dit kan worden betrokken van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Er wordt een vers monster verzameld en dit wordt tijdens transport aëroob gehouden. Na 1 uur bezinken of filtreren door een grof filterpapier wordt het afgeschonken effluent of het filtraat aëroob gehouden zolang als nodig is. Tot 100 ml van dit soort entmateriaal per liter mineraal medium kan gebruikt worden.

Een verdere bron van entmateriaal is oppervlaktewater. In dit geval wordt een monster van een geschikt oppervlaktewater, b.v. rivieren, plassen, verzameld en aëroob gehouden tot het nodig is. Zonodig wordt het entmateriaal door filtreren of centrifugeren geconcentreerd.

1.6.5. Preconditionering van entmateriaal

Entmateriaal kan op de proefomstandigheden worden gepreconditioneerd, maar mag niet vooraf aan de teststof worden aangepast. Preconditionering bestaat uit het beluchten van actief slib gedurende 5-7 dagen in anorganisch medium of secundaire effluent bij de testtemperatuur. Door preconditionering wordt de nauwkeurigheid van de testmethode soms verbeterd doordat de blanco-waarden worden verlaagd. Het wordt niet nodig geacht het entmateriaal voor de MITI-test te preconditioneren.

1.6.6. Niet-biologische controles

Zonodig wordt gecontroleerd op mogelijke niet-biologische afbraak van de teststof door het bepalen van de verwijdering van DOC, de zuurstofopname of de kooldioxyde-ontwikkeling in steriele controles die geen entmateriaal bevatten. Het testmateriaal wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan (0,2-0,45 micrometer) of door toevoeging van een geschikte giftige stof met een geschikte concentratie. Indien gebruik gemaakt wordt van membraanfiltratie, moeten de monsters aseptisch verzameld worden, om de steriliteit ervan te behouden. De adsorptie

van de teststof moet op voorhand uitgesloten worden. Is dit niet het geval, en is het entmateriaal uit actief slib afkomstig, moeten tests waarbij de biologische afbreekbaarheid als DOC-verwijdering bepaald wordt, een abiotische controle bevatten, die geënt en vergiftigd wordt.

1.6.7. Aantal kolven

Het aantal kolven in een doorsnee proef wordt in de betreffende hoofdstukken voor elke test beschreven.

Kolven van het volgende soort kunnen gebruikt worden :

testsuspensie :	met teststof en entmateriaal
entmateriaalblanco :	met entmateriaal alleen
procedurecontrole :	met referentiestof en entmateriaal
abiotische steriele controle :	met teststof—steriel (zie 1.6.6.)
adsorptiecontrole :	met teststof, entmateriaal en steriliserend middel
toxiciteitscontrole :	met teststof, referentiestof en entmateriaal.

Het is beslist nodig de bepalingen in de testsuspensie en entmateriaalblanco parallel uit te voeren. Het is raadzaam de bepalingen in de andere kolf parallel te volgen.

Dit is echter wellicht niet altijd mogelijk. Men dient zich er van te vergewissen dat er voldoende monsters worden genomen of afgelezen om een bepaling van het percentage verwijdering in het venster van 10 dagen mogelijk te maken.

1.7. GEGEVENS EN EVALUATIE

Bij de berekening van D_t , percentage afbraak, worden de gemiddelde waarden van duplo-metingen van de parameter zowel in de testvaten als van de entmateriaalblanco gebruikt. De formules daarvoor zijn vermeld in de onderstaande hoofdstukken die op de afzonderlijke tests betrekking hebben. Het verloop van de afbraak wordt grafisch weergegeven en het 10-dagen venster wordt aangegeven. Het percentage verwijdering dat na afloop van het 10-dagen venster is bereikt en de waarde van het plateau of, indien van toepassing, aan het eind van de test, worden berekend en gerapporteerd.

Bij de respirometrische tests kunnen stikstof bevattende verbindingen door nitrificatie van invloed zijn op de opgenomen hoeveelheid zuurstof (zie Bijlagen II en V).

1.7.1. Afbraak gemeten door middel van DOC-bepaling

Op elk tijdstip van monsterneming moet het percentage afbraak (D_t) voor de kolven met teststof apart, aan de hand van gemiddelden van in duplo gemeten DOC-waarden, berekend worden; het doel hiervan is, de validiteit van de test te bevestigen (zie 1.5.2). Het percentage afbraak wordt met de volgende formule berekend :

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t ,

C_o = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat (mg DOC/l),

C_t = gemiddelde concentratie DOC in het geënte kweekmedium dat de teststof bevat op tijdstip t (mg DOC/l),

C_{bo} = gemiddelde beginconcentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium (mg DOC/l),

C_{bt} = gemiddelde concentratie van DOC in het blanco geënte anorganische medium op tijdstip t (mg DOC/l).

Alle concentraties worden experimenteel gemeten.

1.7.2. Afbraak gemeten door middel van specifieke analyse

Wanneer de specifieke analytische gegevens beschikbaar zijn, wordt de primaire biologische afbraak berekend :

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

waarin:

D_t = % afbraak op tijdstip t , gewoonlijk 28 dagen,

S_a = overblijvende hoeveelheid teststof in het entmedium aan het eind van de test (mg),

S_b = overblijvende hoeveelheid teststof in de blanco test met water/medium waaraan alleen de teststof was toegevoegd (mg).

1.7.3. Niet-biologische afbraak

Indien gebruik wordt gemaakt van een abiotische steriele controle, wordt het percentage niet-biologische afbraak berekend :

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

waarin:

$C_{s(0)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag 0

$C_{s(t)}$ = DOC concentratie in de steriele controle op dag t

I.8. RAPPORTAGE

Het testrapport bevat, voorzover mogelijk, de volgende gegevens :

- teststof en referentiestof en zuiverheid daarvan;
- testomstandigheden;
- entmateriaal : aard en plaats(en) van bemonstering, concentratie en eventuele pre-conditionering;
- indien bekend, hoeveelheid en aard van industrieel afval dat in rioolwater aanwezig is;
- testduur en testtemperatuur;
- in geval van slecht oplosbare teststoffen, de uitgevoerde behandeling;
- toegepaste testmethode; voor elke wijziging van de procedure dienen wetenschappelijke gronden en een toelichting te worden gegeven;
- gegevensformulier;
- alle eventueel waargenomen remmingsverschijnselen;
- eventueel waargenomen niet-biologische afbraak;
- specifieke analytisch-chemische gegevens, indien beschikbaar;
- analytische gegevens over tussenproducten, indien beschikbaar;
- de grafiek van het percentage afbraak tegen de tijd voor de teststof en de referentiestof; de aanloopfase, de afbraakfase, het 10-dagen venster en de helling dienen duidelijk te zijn aangegeven (Bijlage I); indien de test aan de validiteitscriteria heeft voldaan, kan het gemiddelde van de percentages afbraak van de teststof bevattende kolven voor de grafiek gebruikt worden.

— percentage verwijdering na het 10-dagen venster, alsmede op het plateau of aan het eind van de test.

DEEL II. DOC-AFVLAKKINGSTEST (Methode C.4-A)**II.1. PRINCIPE VAN DE METHODE**

Een gemeten volume aan geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie van de teststof (10-40 mg DOC/l) als de enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt bij 22 ± 2 °C in het donker of in gedempt licht belucht.

De afbraak wordt door middel van DOC-analyse met regelmatige tussenpozen gedurende 28 dagen gevolgd. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie aan verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de DOC in de blanco-entmateriaalcontrole) als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie wordt uitgedrukt. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend uit een aanvullende chemische analyse die bij het begin en het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

II.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE**II.2.1. Apparatuur**

- (a) Erlenmeyerkolven, b. v. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;
- (b) Schudmachine geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een voldoende vermogen voor het in stand houden van aërobe omstandigheden in alle kolven;
- (c) Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;
- (d) DOC-analyse-apparaat;

(e) Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;

(f) Centrifuge.

II.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing 1.6.2.

10 ml oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

II.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn : actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie 1.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. en 1.6.5.

II.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof gebracht dat een concentratie met een chemisch equivalent aan 10-40 mg DOC/l wordt verkregen. De pH wordt gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met actief slib of een andere bron van entmateriaal (zie 1.6.4.) tot een uiteindelijke concentratie van niet meer dan 30 mg gesuspendeerde vaste stof per liter wordt verkregen. Tevens worden controles van entmateriaal in anorganisch medium, maar zonder test- of referentiestof, bereid.

Zonodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie 1.6.6.).

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bij voorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

II.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2 : testsuspensie

Kolven 3 en 4 : entmateriaalblanco

Kolf 5 : procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig :

Kolf 6 : abiotische steriele controle

Kolf 7 : adsorptiecontrole

Kolf 8 : toxiciteitscontrole

Zie ook 1.6.7.

II.2.6. Uitvoering van de test

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagen venster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagen venster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zonodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (1.6.1.) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken,

wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd.

Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefilterde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd danwel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 °C of langere tijd beneden -18 °C bewaard.

II.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

II.3.1. Verwerking van resultaten

Het percentage afbraak op tijdstip wordt berekend zoals aangegeven bij 1.7.1. (DOC-bepaling) en, eventueel, bij 1.7.2. (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

II.3.2. Geldigheid van de resultaten

Zie 1.5.2.

II.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

II.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

DOC-AFVLAKKINGSTEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0 : mg/l als teststof

4. ENTMATERIAAL

Herkomst :

Uitgevoerde behandeling :

Pre-conditionering, indien van toepassing :

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel : mg/l.

5. KOOLSTOFBEPALINGEN

Koolstofanalyse-apparaat :

	Kolf nr.		DOC na n dagen (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Teststof plus entmateriaal	1	a ₁					
		a ₂					
		a, gem. C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, gem. C _{b(t)}					
Blanco entmateriaal, zonder teststof	3	c ₁					
		c ₂					
		c, gem. C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, gem. C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS

Kolf nr.		% afbraak na n dagen				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_a(t) - C_{bl}(t)}{C_a(o) - C_{bl}(o)}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_b(t) - C_{bl}(t)}{C_b(o) - C_{bl}(o)}\right) \times 100$	0				
Gem. (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formules kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE (facultatief)

	Tijd (dagen)	
	0	t
DOC.conc. (mg/l) in steriele controle	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE (facultatief)

	resthoeveelheid teststof aan het einde van de test (mg/l)	% primaire afbraak
Steriele controle	S _b	
Geënt testmedium	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEEL III. GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST (Methode C.4-B)

III.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeten volume anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-40 mg DOC/l) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt geënt met 0,5 ml effluent per liter medium. Het mengsel wordt in het donker of in gedempt licht bij 22 ± 2 °C belucht.

De afbraak wordt gedurende 28 dagen met regelmatige tussenpozen gevolgd door middel van DOC-analyse. De mate van biologische afbraak wordt berekend doordat de concentratie verwijderde DOC (gecorrigeerd voor de waarde in de blanco-entmateriaalcontrole) wordt uitgedrukt als percentage van de aanvankelijk aanwezige concentratie. De mate van primaire biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

III.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

III.2.1. Apparatuur

- Erlenmeyerkolven, b.v. 250 ml tot 2 l, afhankelijk van het voor DOC-analyse benodigde volume;
- Schudmachine—geschikt voor de erlenmeyers, hetzij met een automatische temperatuurregeling, hetzij gebruikt in een kamer met constante temperatuur, en met een zodanig vermogen dat in alle kolven aërobe omstandigheden kunnen worden gehandhaafd;
- Filtratie-apparatuur met geschikte membranen;
- DOC-analyse-apparaat;
- Apparatuur voor het bepalen van opgeloste zuurstof;
- Centrifuge

III.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

Bij deze methode wordt slechts 0,5 ml effluent/liter als entmateriaal gebruikt en daarom kan het nodig zijn het medium te versterken met spoorelementen en groeifactoren. Dit geschiedt door toevoeging van 1 ml van elk van de onderstaande oplossingen per liter uiteindelijk medium :

Spoorelementoplossing:

Mangaansulfaat-tetrahydraat, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	39,9 mg
Boorzuur, H_3BO_3 57,2 mg	
Zinksulfaat-heptahydraat, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	42,8 mg
Ammoniumheptamolybdaat, $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-chelaat ($FeCl_3$ -ethyleendiaminetetraazijnzuur)	100,0 mg

Deze stoffen worden opgelost in verdunningswater en de oplossing wordt tot 1000 ml met verdunningswater aangevuld.

Vitamine-oplossing :

Gistextract 15,0 mg

Het gistextract wordt opgelost in 100 ml verdunningswater. De oplossing wordt gesteriliseerd door filtratie door een membraan van 0,2 micron of vers bereid.

III.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal is afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Zie I.6.4.2. en I.6.5.

Hiervan wordt 0,5 ml per liter mineraal medium gebruikt.

III.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld worden porties van 800 ml anorganisch medium in erlenmeyers van 2 liter gebracht en wordt in de afzonderlijke kolven telkens een zodanig volume aan voorraadoplossingen van teststof en referentiestof toegevoegd dat een concentratie met een chemisch equivalent van 10-40 mg DOC/l wordt verkregen. De pH-waarden worden gecontroleerd en, zonodig, op 7,4 bijgesteld. De kolven worden geënt met rioolwaterzuiveringseffluent in een hoeveelheid van 0,5 ml/liter (zie I.6.4.2.). Tevens worden controles voor entmateriaal in het anorganische medium bereid zonder test- of referentiestof.

Zonodig wordt één kolf gebruikt om de eventuele remmende werking van een teststof te controleren door het enten van een oplossing die in het anorganische medium vergelijkbare concentraties van zowel de teststof als de referentiestof bevat.

Tevens wordt, indien nodig, een volgende steriele kolf ingericht voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof door toepassing van een niet-geënte oplossing van de stof (zie I.6.6.).

Indien het vermoeden bestaat dat de teststof in belangrijke mate op glas, slib o.i.d. wordt geadsorbeerd, wordt bovendien in een voorafgaand onderzoek de waarschijnlijke mate van adsorptie en daarmee de geschiktheid van de test voor de desbetreffende stof bepaald (zie Tabel 1). Hiertoe wordt een kolf met de teststof, het entmateriaal en het steriliserend middel bereid.

In alle kolven wordt het volume met anorganisch medium tot 1 l aangevuld en na mengen wordt uit elke kolf een monster genomen ter bepaling van de beginconcentratie aan DOC (zie Bijlage II.4). De openingen van de kolven worden afgedekt, bij voorbeeld met aluminiumfolie, zodanig dat er een ongehinderde uitwisseling van lucht tussen de kolf en de omgevende atmosfeer kan plaatsvinden. Vervolgens worden de kolven op de schudmachine geplaatst en kan de test beginnen.

III.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2 : testsuspensie

Kolven 3 en 4 : entmateriaalblanco

Kolf 5 : procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig :

Kolf 6 : abiotische steriele controle

Kolf 7 : adsorptiecontrole

Kolf 8 : toxiciteitscontrole

Zie ook I.6.7.

III.2.6. Uitvoering van de test

Gedurende de test worden met bepaalde tussenpozen de concentraties aan DOC in elke kolf in duplo bepaald, en wel zo vaak dat het begin van het 10-dagen venster en het percentage verwijdering aan het eind van het 10-dagen venster kunnen worden bepaald. Er wordt geen groter volume aan testsuspensie genomen dan voor elke bepaling nodig is.

Voordat een monster wordt genomen worden zonodig verliezen door verdamping uit de kolven aangevuld door toevoeging van verdunningswater (I.6.1.) in de vereiste hoeveelheid. Voordat een monster wordt onttrokken wordt het kweekmedium grondig vermengd en wordt er zorg voor gedragen dat aan de wanden van de kolf hechtend materiaal wordt opgelost of gesuspendeerd. Onmiddellijk nadat het monster is genomen wordt het met een membraan gefiltreerd of gecentrifugeerd (zie Bijlage II.4). De afgefilterde of gecentrifugeerde monsters worden op dezelfde dag geanalyseerd danwel gedurende maximaal 48 uur bij 2-4 °C of langere tijd beneden -18 °C bewaard.

III.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

III.3.1. Verwerking van de resultaten

Het percentage afbraak op tijdstip t wordt berekend zoals aangegeven bij I.7.1. (DOC-bepaling) en, eventueel, bij I.7.2. (specifieke analyse).

Alle resultaten worden op de daartoe bestemde gegevensformulieren ingevuld.

III.3.2. Geldigheid van de resultaten

Zie 1.5.2.

III.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

III.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder wordt een voorbeeld van een gegevensformulier gegeven.

GEWIJZIGDE OESO-SCREENING TEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, t_0 : mg/l als teststof

4. ENTMATERIAAL

Herkomst :

Uitgevoerde behandeling :

Pre-conditionering, indien van toepassing :

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel : mg/l

5. KOOLSTOFBEPALINGEN

Koolstofanalyse-apparaat :

	Kolf nr.		DOC na n dagen (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Teststof plus entmateriaal	1	a_1					
		a_2					
		a, gem. $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2 b, gem. $C_{b(t)}$					
Blanco entmateriaal, zonder teststof	3	c_1					
		c_2					
		c, gem. $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, gem. $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. EVALUATIE VAN VERKREGEN GEGEVENS

Kolf nr.		% afbraak na n dagen				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Gem. (*)	$D = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

Opmerking: soortgelijke formules kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en toxiciteitscontroles.

7. NIET-BIOLOGISCHE CONTROLE (facultatief)

	Tijd (dagen)	
	0	t
DOC-conc. (mg/l) in steriele controle	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFIEKE SCHEIKUNDIGE ANALYSE (facultatief)

	resthoeveelheid teststof aan het einde van de test	% primaire afbraak
Steriele controle	S _b	
Geënt testmedium	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

DEEL IV. KOOLDIOXYDE CO₂-ONTWIKKELINGSTEST (Methode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

Een gemeen volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (10-20mg DOC of TOC/l) als enige nominale bron van organische koolstof bevat wordt belucht door doorleiden van kooldioxyde-vrije lucht met een geregelde snelheid, in het donker of in gedempt licht. De afbraak wordt gedurende 28 dagen gevolgd door bepaling van het geproduceerde kooldioxyde dat in barium- of natriumhydroxyde wordt afgevangen en door titratie van het resterende hydroxyde of als anorganische koolstof wordt gemeten. De hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde uit de teststof (gecorrigeerd voor datgene dat afkomstig is van het blanco entmateriaal) wordt uitgedrukt als een percentage van ThCO₂. De mate van biologische afbraak kan ook worden berekend aan de hand van een aanvullende DOC-analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd.

IV.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

IV.2.1. Apparatuur

- Kolven, inhoud 2-5 liter, elk voorzien van een beluchtingsbuis die tot onder in de kolf reikt en een uitgang;
- Magneetroeders, indien slecht oplosbare stoffen worden bepaald;
- Gas-absorptieflessen;

- d) Inrichting voor het regelen en meten van de luchtstroom;
- e) Apparatuur voor het uitwassen van kooldioxyde, voor het bereiden van lucht die vrij is van kooldioxyde; in plaats daarvan kan een mengsel van CO₂-vrije zuurstof en CO₂-vrije stikstof uit gascilinders in de juiste verhouding (20 % O₂ : 80 % N₂) worden gebruikt;
- f) Inrichting voor het bepalen van kooldioxyde, hetzij titrimetrisch hetzij met behulp van een of ander analyse-apparaat voor anorganische koolstof;
- g) Inrichting voor membraanfiltratie (facultatief);
- h) DOC-analyse-apparaat (facultatief).

IV.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen, I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

IV.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn : actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. en I.6.5.

IV.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Bij wijze van voorbeeld geven de onderstaande volumes en gewichten de waarden aan voor 5-literkolven die 3 l suspensie bevatten. Indien kleinere volumes worden gebruikt, worden de waarden dienovereenkomstig aangepast, maar er dient op te worden toegezien dat het gevormde kooldioxyde nauwkeurig kan worden gemeten

In elke 5-literkolf wordt 2 400 ml anorganisch medium gebracht. Daaraan wordt een zodanig volume van het bereide actieve slib (zie I.6.4.1. en I.6.5.) toegevoegd dat een concentratie aan gesuspendeerde deeltjes van niet meer dan 30 mg/l in het uiteindelijke 3 l geënt mengsel wordt verkregen. In plaats daarvan kan eerst het bereide slib worden verdund tot een suspensie van 500-1 000 mg/l in het anorganische medium voordat een berekende hoeveelheid daarvan aan de 2 400 ml anorganisch medium in de 5-literkolf wordt toegevoegd om een concentratie van 30 mg/l in het uiteindelijke 3 l proefvolume te verkrijgen. Dit gaat gepaard met een grotere nauwkeurigheid. Ook andere bronnen van entmateriaal kunnen worden gebruikt (zie I.6.4.2.).

De geënte mengsels worden gedurende een nacht belucht met CO₂-vrije lucht zodat kooldioxyde uit het systeem wordt verwijderd.

In telkens een aantal gelijke kolven worden afzonderlijk testmateriaal en referentiestof als gekende volumes voorraadoplossingen toegevoegd tot concentraties als gevolg van de toegevoegde stoffen van 10 tot 20 mg DOC of TOC/l; enkele kolven blijven zonder toevoeging van chemicaliën en dienen als controle op het entmateriaal. Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks in de kolven gebracht op basis van gewicht of volume of worden behandeld als beschreven in Bijlage III.

Zonodig wordt één kolf gebruikt voor de controle op het eventuele remmende effect van de teststof waarbij zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de andere kolven worden toegevoegd.

Tevens wordt indien nodig een steriele kolf gebruikt voor de controle op de eventuele niet-biologische afbraak van de teststof, waarbij een niet-geënte oplossing van de stof wordt gebruikt (zie I.6.6.). Steriliseren door toevoeging van een giftige stof met de geschikte concentratie.

Het volume van de suspensies wordt in alle kolven aangevuld tot 3l door toevoeging van anorganisch medium dat vooraf met CO₂-vrije lucht is belucht. Eventueel kunnen monsters worden getrokken voor analyse van DOC (zie Bijlage II.4) en/of specifieke analyse. De absorptieflessen worden aangesloten op de luchtuitgangen van de kolven.

Indien bariumhydroxyde wordt gebruikt, worden drie absorptiekolven, die elk 100 ml 0,0125 M bariumhydroxyde-oplossing bevatten, in serie op elke 5-literkolf aangesloten. De oplossing moet vrij van neergeslagen sulfaat en carbonaat zijn en de concentratie moet vlak voor gebruik worden bepaald. Indien natriumhydroxyde wordt gebruikt, worden twee vallen aangesloten, waarbij de tweede dient als controle om aan te tonen dat alle kooldioxyde in de eerste is geabsorbeerd. Bruikbaar zijn absorptiekolven die zijn voorzien van sluitingen voor serumflessen. In elke kolf wordt 200 ml 0,05 M natriumhydroxyde gebracht, welke hoeveelheid voldoende is voor het absorberen van de totale hoeveelheid kooldioxyde die bij volledige afbraak van de teststof wordt ontwikkeld. De natriumhydroxyde-oplossing zal echter, zelfs indien deze vers is bereid, sporen carbonaten bevatten; dit wordt gecorrigeerd door aftrek van het carbonaat in de blanco.

IV.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2 : testsuspensie

Kolven 3 en 4 : entmateriaalblanco

Kolf 5 : procedurecontrole

en bij voorkeur en zo nodig :

Kolf 6 : abiotische steriele controle

Kolf 7 : toxiciteitscontrole

Zie gok I.6.7.

IV.2.6. Uitvoering van de test

De test wordt gestart doordat CO₂-vrije lucht met een snelheid van 30-100 ml/min. door de suspensies wordt geborreld. Van tijd tot tijd worden monsters van het kooldioxyde absorberende materiaal genomen voor analyse van het CO₂-gehalte. Tijdens de eerste tien dagen verdient het aanbeveling elke tweede of derde dag analyses uit te voeren en vervolgens elke vijfde dag tot de 28e dag zodat het 10-dagen venster kan worden vastgesteld.

Op de 28e dag worden (indien van toepassing) monsters getrokken voor DOC-analyse en/of specifieke analyse, wordt de pH van de suspensies gemeten en wordt aan elke kolf 1 ml geconcentreerd zoutzuur toegevoegd; de kolven worden gedurende een nacht belucht teneinde het in de testsuspensies aanwezige kooldioxyde te verdrijven. Op dag 29 wordt de laatste analyse van vrijgekomen kooldioxyde gemaakt.

Op de dagen van CO₂-meting wordt de absorptiefles voor bariumhydroxyde die het dichtst bij de kolf staat, losgekoppeld en wordt de hydroxyde-oplossing getitreerd met 0,05 M HCl met fenolftaleïne als indicator. De overige absorptieflessen worden een plaats dicht bij de kolf gebracht en er wordt een nieuwe absorptiefles met daarin 100 ml vers 0,0125 M bariumhydroxyde aan het eind van de reeks geplaatst. De titraties worden uitgevoerd wanneer dat nodig is, bij voorbeeld wanneer in de eerste val een aanzienlijke hoeveelheid neerslag wordt waargenomen en voordat er in de tweede val een duidelijke neerslag is, of ten minste wekelijks. In het andere geval wordt, wanneer NaOH absorptiemiddel is, met een spuit een klein monster (afhankelijk van de kenmerken van de gebruikte koolstof-analysator) van de natriumhydroxyde-oplossing in de absorptiefles die het dichtst bij de kolf staat, getrokken. Het monster wordt in het IC-gedeelte van het koolstofanalyse-apparaat gespoten en rechtstreeks geanalyseerd op ontwikkelde kooldioxyde.

De inhoud van de tweede val wordt alleen aan het eind van de test geanalyseerd ter correctie van eventuele overdracht van kooldioxyde.

IV.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

IV.3.1. Verwerking van de resultaten

De hoeveelheid in een absorptiefles afgevangen CO₂ die wordt getitreerd komt overeen met:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

waarin:

V = volume HCl dat is gebruikt voor het titreren van de 100 ml in de absorptiefles (ml),

C_B = concentratie bariumhydroxyde-oplossing (M),

C_A = concentratie zoutzuuroplossing (M),

en, indien C_B 0,0125 M en C_A 0,05 M is, is de getitreerde hoeveelheid voor 100 ml bariumhydroxyde 50 ml en wordt het gewicht aan CO₂ gegeven door:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml getitreerd HCl} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

In dit geval bedraagt dus de factor voor het herleiden van het getitreerde volume HCl tot geproduceerde mg CO₂ 1,1.

Het CO₂-gewicht dat afkomstig is uit alleen het entmateriaal en dat wat afkomstig is van het entmateriaal plus de teststof worden berekend met de desbetreffende titratiewaarden en het verschil is het gewicht aan CO₂ dat alleen door de teststof is geproduceerd.

Indien bij voorbeeld het entmateriaal alleen een titratie van 48 ml en het entmateriaal plus teststof 45 ml geeft, dan geldt:

$$\text{CO}_2 \text{ uit entmateriaal} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ uit entmateriaal plus teststof} = 1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$$

en derhalve bedraagt het gewicht aan CO₂ dat door teststof is produceerd 3,3 mg.

Het percentage biologische afbraak wordt berekend uit:

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg toegevoegde teststof}}$$

of,

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ geproduceerd} \times 100}{\text{mg TOC toegevoegd in test} \times 3,67}$$

waarbij 3,67 de omrekeningsfactor (44/12) van koolstof naar kooldioxyde is.

Het percentage afbraak na elk tijdsinterval wordt verkregen door optellen van het percentage van ThCO₂-waarden dat voor elk van de dagen, tot het tijdstip waarop het is gemeten, is berekend.

Voor natriumhydroxyde-absorptieflessen wordt de hoeveelheid geproduceerd kooldioxyde berekend en uitgedrukt als IC (mg) door vermenigvuldiging van de concentratie IC in het absorptiemiddel met het volume van het absorptiemiddel.

Het percentage afbraak wordt berekend uit :

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC uit testkolf} - \text{mg IC uit blanco}}{\text{mg TOC toegevoegd als teststof}} \times 100$$

De verwijdering van DOC (indien van toepassing) wordt berekend zoals beschreven onder 1.7. Deze en alle andere resultaten worden op het beschikbare gegevensformulier vermeld.

IV.3.2. Geldigheid van de resultaten

Het IC-gehalte van de suspensie van teststof in het anorganische medium aan het begin van de test moet minder dan 5 % bedragen van de TC en de totale CO₂-ontwikkeling in de entmateriaal-blanco aan het eind van de test mag doorgaans niet meer dan 40 mg/l medium bedragen. Indien waarden van meer dan 70 mg CO₂/l worden verkregen, dienen de gegevens en de proefopzet kritisch te worden onderzocht.

Zie ook I.5.2.

IV.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

IV.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

KOOLDIOXYDE (CO₂)-ONTWIKKELINGSTEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu : mg/l als teststof

Totale C aan kolf toegevoegd : mg C

ThCO₂ : mg CO₂

4. ENTMATERIAAL

Herkomst :

Uitgevoerde behandeling :

Pre-conditionering, indien van toepassing :

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel : mg/l

5. **KOOLDIOXYDEPRODUCTIE EN AFBREEKBAARHEID:**

Methode: Ba(OH)₂/NaOH/andere

Tijd (dag)	Gevormde CO ₂ test (mg)		Gevormde CO ₂ blanco (mg)		Gevormde CO ₂ cumulatief (mg) (test minus blanco gem.)		% ThCO ₂ $\frac{\text{cumulatief CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1	2	3	4	1	2	1	2	gem.
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Opmerking: soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentiestof en voor toxiciteitscontroles.

6. **KOOLSTOFANALYSE (facultatief)**

Koolstofanalyse-apparaat: ...

Tijd (dag)	Blanco mg/l	Teststof mg/l
0	C _{b(0)}	C ₀
28 (*)	C _{b(t)}	C _t
(*) of aan het eind van de incubatie		

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. **NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK (facultatief)**

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{\text{CO}_2\text{-vorming in steriele kolf na 28 dagen (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

DEEL V. MANOMETRISCHE RESPIROMETRIE TEST (Methode C.4-D)**V.1. PRINCIPE VAN DE METHODE**

Een gemeten volume geënt anorganisch medium dat een bekende concentratie teststof (100 mg/l teststof die ten minste 50-100 mg ThOD/l geeft) als enige nominale bron van organische koolstof bevat, wordt gedurende ten hoogste 28 dagen in een gesloten kolf bij een constante temperatuur (± 1 °C of minder) geroerd. Het gebruik aan zuurstof wordt bepaald hetzij door meten van hoeveelheid zuurstof (elektrolytisch geproduceerd) die nodig is om in de respirometerkolf een constant gasvolume te behouden, hetzij op grond van de verandering van het volume of van de druk (of een combinatie daarvan) in de apparatuur. Ontwikkelde kooldioxyde wordt geabsorbeerd in een oplossing van kaliumhydroxyde of een ander geschikt absorptiemiddel. De hoeveelheid door de teststof opgenomen zuurstof (gecorrigeerd voor opneming door de parallel behandelde blanco-entstof) wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD. Facultatief kunnen de primaire biologische afbraak worden berekend uit de aanvullende specifieke analyse die aan het begin en aan het einde van de incubatie wordt uitgevoerd, en de totale afbraak door DOC-analyse.

V.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE**V.2.1. Apparatuur**

- (a) geschikte respirometer;
- (b) temperatuurregeling, constant op ± 1 °C of beter;
- (c) membraan-filtratie-inrichting (facultatief);
- (d) koolstof analyse-apparaat (facultatief).

V.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossingen I.6.2.

10 ml van oplossing (a) wordt gemengd met 800 ml verdunningswater, daaraan wordt 1 ml van de oplossingen (b) t/m (d) toegevoegd en het geheel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

V.2.3. Bereiding en pre-conditionering van entmateriaal

Het entmateriaal kan van diverse bronnen afkomstig zijn : actief slib, behandeld water, oppervlaktewater en grond of een mengsel daarvan.

Zie I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. en I.6.5.

V.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Oplossingen van de teststof en referentiestof worden afzonderlijk in anorganisch medium, uitgaande van voorraadoplossingen, bereid in een hoeveelheid die doorgaans overeenkomt met een concentratie van 100 mg chemische stof/l (overeenkomend met ten minste 50-100 mg ThOD/l).

Het ThOD wordt berekend op basis van de vorming van ammoniumzouten, tenzij nitrificatie moet worden verwacht, in welk geval de berekening moeten worden gebaseerd op nitraatvorming (zie Bijlage II.2.).

De pH-waarden worden bepaald en zonodig bijgesteld op $7,4 \pm 0,2$.

Slecht oplosbare stoffen dienen pas in een later stadium te worden toegevoegd (zie hieronder).

Indien de giftigheid van de teststof moet worden bepaald, wordt nog een oplossing in anorganisch medium bereid welke zowel de teststof als de referentiestof in dezelfde concentraties als in de afzonderlijke oplossingen bevat.

Indien meting van de fysisch-chemische zuurstofopname nodig is, wordt een oplossing van de teststof die door toevoeging van een geschikte giftige stof gesteriliseerd is (zie I.6.6.) in een hoeveelheid van gewoonlijk 100 mg ThOD/l bereid.

Het benodigde volume van oplossingen van de teststof en de referentiestof wordt ten minste in duplo in kolven gebracht. In volgende kolven wordt alleen anorganisch medium gebracht (voor entstof controles) en, zonodig, de gemengde oplossing van teststof en referentiestof en de steriele oplossing.

Indien de teststof slecht oplosbaar is wordt deze in dit stadium rechtstreeks toegevoegd op basis van gewicht of volume of wordt deze behandeld als beschreven in Bijlage III. Aan de compartimenten van het CO₂-absorptie-apparaat worden kaliumhydroxyde, natronkalkpillen of een ander absorptiemiddel toegevoegd.

V.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

Kolven 1 en 2 : testsuspensie

Kolven 3 en 4 : entmateriaalblanco

Kolf 5 : procedurecontrole

bij voorkeur en zo nodig :

Kolf 6 : steriele controle

Kolf 7 : toxiciteitscontrole

Zie I.6.7.

V.2.6. Uitvoering van de test

De kolven worden op de gewenste temperatuur gebracht en de daartoe bestemde kolven worden geënt met bereid actief slib of een andere bron van entmateriaal tot een concentratie aan gesuspendeerde vaste stof van niet meer dan 30 mg/l. De apparatuur wordt in gereedheid gebracht, de roerder wordt aangezet, het geheel wordt gecontroleerd op luchtdichtheid en de meting van de zuurstofopname wordt gestart. Gewoonlijk is dan geen verdere aandacht nodig behalve voor de nodige aflezingen en voor de dagelijkse controle op de juiste temperatuur en het juiste roeren.

De zuurstofopname wordt met behulp van de door de fabrikant van de apparatuur verstrekte methoden berekend uit de met regelmatige tussenpozen verrichte aflezingen. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk na 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten, in het bijzonder indien de opgenomen hoeveelheid zuurstof lager is dan wel hoger is dan ThOD_{NH4} (voor stikstof bevattende verbindingen).

Indien nodig worden aan het begin en aan het eind monsters uit de respirometerkolven genomen voor analyse van DOC of specifieke chemische stof (zie Bijlage II.4.). Bij monsterneming aan het begin dient er voor te worden gezorgd dat het volume van de in de kolf achterblijvende testsuspensie bekend is. Wanneer door een N-bevattende teststof zuurstof wordt opgenomen, wordt de toename van de concentratie nitriet en nitraat in 28 dagen bepaald en wordt de correctie voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof berekend (Bijlage V).

V.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

V.3.1. Verwerking van de resultaten

De opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg) van de teststof na een bepaalde tijd (die is gecorrigeerd voor de blanco entstofcontrole na dezelfde tijd) wordt gedeeld door het gewicht van de onderzochte teststof. Dit geeft het BOD die is uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2\text{-opname door teststof} - \text{mg O}_2\text{-opname door blanco}}{\text{mg teststof in kolf}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ per mg teststof.}$$

Het percentage biologische afbraak wordt berekend hetzij uit:

$$\% \text{ biologische afbraak} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg stof)}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg stof)}} \times 100$$

hetzij uit

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg stof)}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg stof)}} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet noodzakelijk dezelfde waarde geven; bij voorkeur wordt de eerstgenoemde methode gebruikt.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH₄ of NO₃) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door de nitrificatie verbruikte zuurstof (Bijlage V).

Wanneer facultatieve bepalingen van organische koolstof en/of specifieke chemische stof worden uitgevoerd, wordt het percentage afbraak berekend zoals beschreven is onder I.7.

Alle resultaten worden op de bijgevoegde gegevensformulieren vermeld.

V.3.2. Geldigheid van de resultaten

De hoeveelheid opgenomen zuurstof van de entmateriaalblanco bedraagt normaal 20-30 mg O₂/l en mag in 28 dagen niet groter zijn dan 60 mg/l. Waarden hoger dan 60 mg/l nopen tot een kritisch onderzoek van de gegevens en de experimentele technieken. Indien de pH-waarde buiten het gebied 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de teststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test te worden herhaald met een lagere concentratie teststof.

Zie ook I.5.2.

V.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

V.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier.

MANOMETRISCHE RESPIROMETRIE TEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l

Beginconcentratie in het milieu, C₀ : mg/l

Volume in de testkolf (V) : ml

ThOD stof/COD stof : mg O₂/mg (NH₄, NO₃)

4. ENTMATERIAAL

Herkomst :

Uitgevoerde behandeling :

Pre-conditionering, indien van toepassing :

Concentratie van gesuspendeerde vaste stof in reactiemengsel : mg/l

5. ZUURSTOFOPNAME: BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

		Zeit (Lage)									
		0		7		14		21		28	
O ₂ opname (mg) teststof	1										
	2										
	a, gem.										
O ₂ opname (mg) blanco	3										
	4										
	b, gem.										
Gecorrigeerde BOD (mg)	(a ₁ - b _m)										
	(a ₂ - b _m)										
BOD per mg reststof	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$										
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$										
% afbraak	D ₁ (a ₁)										
	D ₂ (a ₂)										
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	gem. *										

V = volume medium in testkolf

* Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

6. CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE (zie Bijlage V)

Dag	0	28	Verschild
(i) Concentratie nitraat (mg N/l)			(N)
(ii) Zuurstofequivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
(iii) Concentratie nitriet (mg N/l)			(N)
(iv) Zuurstofequivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Totaal zuurstofequivalent	—	—	

7. KOOLSTOF ANALYSE (facultatief)

Koolstof analyse-apparaat: ...

Tijd (dag)	Blanco mg/l	Teststof mg/l
0	(C _{blo})	(C ₀)
28*	(C _{bt})	(C _t)

* of aan het eind van de incubatie

$$\% \text{ DOC verwijderd} = \left(1 - \frac{C_t - C_{bfr}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE (facultatief)

S_b = concentratie in fysisch-chemische (steriele) controle na 28 dagen.

S_a = concentratie in de geënte kolf na 28 dagen.

$$\% \text{ biologische afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK (facultatief)

a = zuurstofverbruik in steriele kolven na 28 dagen, (mg).

$$\text{Zuurstofverbruik per mg teststof} = \frac{a}{C_o V}$$

(zie afdelingen 1 en 3)

$$\% \text{ niet-biologische afbraak} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

DEEL VI. GESLOTEN-FLESTEST (Methode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De oplossing van de teststof in anorganisch medium, doorgaans met een concentratie van 2-5 mg/l, wordt geënt met een betrekkelijk gering aantal micro-organismen uit een gemengde populatie en wordt bij constante temperatuur in het donker in volledig gevulde, afgesloten flessen gehouden. De afbraak wordt gevolgd door analyse van opgeloste zuurstof gedurende 28 dagen. De door de teststof opgenomen hoeveelheid zuurstof, die wordt gecorrigeerd voor de opname door de parallel onderzochte blanco voor het entmateriaal, wordt uitgedrukt als percentage ThOD of COD.

VI.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VI.2.1. Apparatuur

- BOD-flessen met glazen stoppen, b.v. 250-350 ml;
- Waterbad of broedapparaat, voor het op constante temperatuur (± 1 °C of beter) houden van de flessen, met uitsluiting van licht;
- Grote glazen flessen (2-5 l) voor de bereiding van medium en voor het aanvullen van de BOD-flessen;
- Zuurstofelektrode en meter, of apparatuur en reagentia voor Winkler-titratie.

VI.2.2. Bereiding van anorganisch medium

Zie voor de bereiding van de voorraadoplossing I.6.2.

1 (een) ml van oplossingen (a) t/m (d) wordt gemengd en het mengsel wordt met verdunningswater tot 1 l aangevuld.

VI.2.3. Bereiding van het entmateriaal

Het entmateriaal is normaal afkomstig van het secundaire effluent van een zuiveringsinstallatie of een laboratoriuminstallatie die hoofdzakelijk huishoudelijk afvalwater ontvangt. Een alternatieve bron van entmateriaal is oppervlaktewater. Gewoonlijk wordt één druppel (0,05 ml) tot 5 ml filtraat per liter medium gebruikt; voorafgaandelijke proeven kunnen nodig zijn om het optimaal volume voor een gegeven effluent te bepalen (zie I.6.4.2. en I.6.5.).

VI.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

Anorganisch medium wordt gedurende ten minste 20 min. krachtig belucht. Elke testreeks wordt met uit dezelfde voorraad afkomstig mineraal medium uitgevoerd. In het algemeen is het medium na 20 uur staan bij de testtemperatuur voor gebruik gereed. Ter controle wordt de concentratie opgeloste zuurstof bepaald; de waarde dient bij 20 °C ongeveer 9 mg/l te zijn. Alle overbreng- en aanvulhandelingen van het met lucht verzadigde medium dienen zonder bellen, bijvoorbeeld door gebruik van hevels, te worden uitgevoerd.

Voor de bepaling van de teststof en referentiestof in gelijktijdige proefseries worden parallelle groepen van BOD-flessen bereid. Een voldoende aantal BOD-flessen, waaronder entmateriaalblanco's worden gereed gemaakt zodat op de gewenste tijdstippen, bijvoorbeeld na 0, 7, 14, 21 en 28 dagen, ten minste duplo-metingen van het zuurstofgebruik kunnen worden gedaan. Om het 10-dagen venster met zekerheid te kunnen vaststellen kunnen meer flessen nodig zijn.

In grote flessen wordt volledig belucht anorganisch medium gebracht, zodanig dat de flessen voor ongeveer eenderde gevuld zijn. Vervolgens wordt in afzonderlijke grote flessen zoveel van de voorraadoplossingen van de teststof en referentiestof gebracht dat de uiteindelijke concentratie van de stoffen niet meer dan ongeveer 10 mg/l is. Aan het blanco-controlemedium dat in een andere grote fles aanwezig is, wordt geen chemische stof toegevoegd.

Teneinde zekerheid te geven dat de activiteit van het entmateriaal niet beperkend is, mag de concentratie opgeloste zuurstof in de BOD-flessen niet lager dan 0,5 mg/l zijn. Dit beperkt de concentratie van de teststof tot ongeveer 2 mg/l. Van slecht afbreekbare teststoffen en van teststoffen met een lage ThOD kan echter 5-10 mg/l worden gebruikt. In sommige gevallen kan het raadzaam zijn twee parallelle reeksen van de teststof bij twee verschillende concentraties, bijvoorbeeld 2 en 5 mg/l uit te voeren. Als regel wordt de ThOD op grond van de vorming van ammoniumzouten berekend maar indien verwacht wordt of bekend is dat nitrificatie optreedt, wordt de berekening uitgevoerd op basis

van de vorming van nitraat ($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$; zie Bijlage II.2). Indien nitrificatie evenwel niet volledig is of niet optreedt, wordt gecorrigeerd voor de veranderingen in concentratie nitriet en nitraat, zoals door analyse is vastgesteld (zie Bijlage V).

Indien de toxiciteit van de teststof moet worden onderzocht (bijvoorbeeld in het geval dat eerder een lage waarde voor de biologische afbreekbaarheid is gevonden) is een volgende reeks flessen nodig.

Een volgende grote fles wordt gevuld met belucht anorganisch medium (tot ongeveer een-derde van het volume) plus teststof en referentiestof met uiteindelijke concentraties die als regel dezelfde zijn als die in de andere grote flessen.

De oplossingen in de grote flessen worden met secundair effluent (een druppel of ongeveer 0,05 ml, tot 5 ml/l) of met een andere bron, zoals rivierwater geënt (zie I.6.4.2.). Tenslotte worden de oplossingen met belucht anorganisch medium tot het eindvolume aangevuld met behulp van een hevel die met het oog op een voldoende menging tot op de bodem van de fles reikt.

VI.2.5. Aantal kolven in een doorsnee-proef

In een doorsneebepaling worden de volgende flessen gebruikt :

ten minste 10 die teststof en entmateriaal bevatten (testsuspensie),

ten minste 10 met alleen entmateriaal (entmateriaalblanco),

ten minste 10 met referentiestof en entmateriaal (procedurecontrole),

en, zondig 6 flessen met teststof, referentiestof en entmateriaal (toxiciteitscontrole). Om zekerheid te geven dat het 10-dagen venster kan worden vastgesteld zal ongeveer het dubbele aantal flessen nodig zijn

VI.2.6. Uitvoering van de test

Elke bereide oplossing wordt met behulp van een hevel uit het onderste kwart (niet de bodem) van de desbetreffende grote fles onmiddellijk in de bijbehorende groep BOD-flessen overgebracht, zodat alle BOD-flessen volledig gevuld zijn. Er wordt zachtjes op de kolven geklopt om eventuele luchtbellen te verwijderen. De flessen van het tijdstip nul worden onmiddellijk op opgeloste zuurstof onderzocht met behulp van de Winkler-methode of met elektrode methoden. De inhoud van de flessen kan met het oog op latere analyse via de Winkler-methode worden bewaard door toevoeging van mangaan(II)sulfaat en natriumhydroxyde (het eerste Winkler-reagens). De zorgvuldig afgesloten flessen die de zuurstof als bruin gehydrateerd mangaan(III)oxyde gefixeerd bevatten, worden gedurende niet langer dan 24 uur bij 10-20 °C in het donker bewaard, voordat de overige stappen van de Winkler-methode worden uitgevoerd. De overige herhalingsflessen worden afgesloten zodanig dat er geen luchtbellen worden opgesloten en worden in het donker bij 20 °C geïncubeerd. Elke reeks moet vergezeld gaan van een volledige parallelreeks voor de bepaling van het geënte blanco-medium. Voor analyse van opgelost zuurstof op gezette tijden (ten minste wekelijks) gedurende de bebroeding van 28 dagen wordt van elke reeks ten minste één duplofles genomen.

Wekelijkse monsterneming is voldoende voor de bepaling van het percentage verwijdering in een 14-dagen venster, terwijl een bemonstering om de 3-4 dagen het vaststellen van een 10-dagen venster mogelijk maakt, waarbij ongeveer tweemaal zoveel flessen nodig zijn.

Voor stikstof bevattende teststoffen moeten correcties voor de door eventueel optredende nitrificatie veroorzaakte zuurstofopname worden uitgevoerd. Hiertoe wordt de methode met de O_2 -elektrode toegepast voor de bepaling van de concentratie opgeloste zuurstof, waarna uit de BOD-fles een monster wordt genomen voor analyse van nitriet en nitraat. Uit de toename van de concentratie nitriet en nitraat wordt de gebruikte hoeveelheid zuurstof berekend (zie Bijlage V).

VI.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VI.3.1. Verwerking van de resultaten

Allereerst wordt het BOD dat na elk tijdstip is opgetreden berekend door aftrekken van de zuurstofafname ($\text{mg O}_2/\text{l}$) van de entmateriaal-blanco van de afname als gevolg van de teststof. Deze gecorrigeerde afname wordt gedeeld door de concentratie (mg/l) van de teststof waarbij het specifieke BOD als mg zuurstof per mg teststof wordt verkregen. Het percentage biologische afbreekbaarheid wordt berekend door het specifieke BOD door het specifieke ThOD (dat is berekend volgens Bijlage II.2) of COD (door analyse bepaald, zie Bijlage II.3) te delen, dus :

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg O}_2 \text{ opname door blanco}}{\text{mg teststof in de kolf}}$$

$$= \text{mg O}_2 \text{ per mg teststof.}$$

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

ofwel

$$\% \text{ afbraak} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg teststof)}}{\text{COD (mg O}_2/\text{mg teststof)}} \times 100$$

Opgemerkt dient te worden dat deze twee methoden niet dezelfde uitkomst behoeven te geven; het gebruik van de eerste methode heeft de voorkeur.

Voor teststoffen die stikstof bevatten wordt het geschikte ThOD (NH_4 of NO_3) gebruikt, afhankelijk van hetgeen bekend is of verwacht wordt omtrent het optreden van nitrificatie (Bijlage II.2). Indien nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt uit de verandering in concentraties nitriet en nitraat een correctie berekend voor de door nitrificatie verbruikte zuurstof (zie Bijlage V).

VI.3.2. Geldigheid van de resultaten

De afname van de hoeveelheid zuurstof in de entmateriaal-blanco mag na 28 dagen niet meer dan 1,5 mg opgeloste zuurstof/l bedragen. Bij hogere waarden dan deze moeten de experimentele technieken worden doorgelicht. De restconcentratie zuurstof in de testflessen mag nooit minder dan 0,5 mg/l worden. Dergelijke lage zuurstofconcentraties zijn slechts geldig, indien met de methode waarmee opgeloste zuurstof wordt bepaald dergelijke concentraties nauwkeurig kunnen worden gemeten.

Zie ook I.5.2.

VI.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

VI.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

GESLOTEN-FLESTEST**1. LABORATORIUM****2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST****3. TESTSTOF**

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l

Beginconcentratie in de fles : mg/l

ThOD/COD : mg O₂/mg teststof

4. ENTMATERIAAL

Herkomst :

Uitgevoerde behandeling :

Pre-conditionering, indien van toepassing :

Concentratie in reactiemengsel : mg/l

5. DO-BEPALING

Methode : Winkler/elektrode

Analyses kolven

	Duur van incubatie (d)		DO (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Blanco (zonder stof)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Gem.	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Teststof	1	a ₁				
	2	a ₂				
Gem.	$m_r = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

6. CORRECTIE VOOR NITRIFICATIE (zie Bijlage V)

Duur van incubatie (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Concentratie nitraat (mg N/l)				
(ii) Verandering in nitraatconcentr. (mg N/l)	—			
(iii) Zuurstofequivalent (mg/l)	—			
(iv) Concentratie nitriet (mg N/l)				
(v) Verandering in nitrietconcentr. (mg N/l)	—			
(vi) Zuurstofequivalent (mg/l)	—			
(iii + vi) Totaal zuurstofequivalent (mg/l)	—			

7. DO-AFNAME: % AFBRAAK

	Afname na n dagen (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
FLES 1: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
FLES 2: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
FLES 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$				
FLES 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{conc. test} \times \text{ThOD stof}}$				
$\% D \text{ gem. } * = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

m_{to} = waarde in de testkolf op tijdstip 0

m_{tx} = waarde in de testkolf op tijdstip x

m_{bo} = gem. blanco waarde op tijdstip 0

m_{bx} = gem. blanco waarde op tijdstip x

Ook de correctie voor nitrificatie uit iii + vi in afdeling 6 dient te worden toegepast.

8. BLANCO DO - AFNAME

Zuurstofverbruik door blanco: (m_{bo} - m_{b28}) mg/l. Dit verbruik is van belang voor de geldigheid van de test. Het dient minder dan 1,5 mg/l te zijn.

DEEL VII. M.I.T.I.-TEST (Methode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE VAN DE METHODE

De zuurstofopname door een geroerde oplossing of suspensie van de teststof in een anorganisch medium dat met speciaal gekweekte, niet-aangepaste micro-organismen is geënt, wordt automatisch gedurende 28 dagen bij 25 ± 1 °C in een verduisterde, afgesloten respirometer automatisch gemeten. Het vrijkomende kooldioxyde wordt door natronkalk geabsorbeerd. De biologische afbreekbaarheid wordt uitgedrukt als het percentage zuurstofopname (gecorrigeerd voor opname door de blanco) van de theoretische opname (ThOD). Het percentage primaire biologische afbreekbaarheid wordt ook berekend uit een aanvullende specifieke chemische analyse die aan het begin en aan het eind van de incubatie wordt uitgevoerd en verder, naar keuze, door middel van DOC-analyse.

VII.2. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

VII.2.1. Apparatuur

- Automatische elektrolytische BOD-meter of respirometer, doorgaans uitgerust met 6 flessen, met elk 300 ml en voorzien van kommetjes die het absorptiemiddel voor CO₂ bevatten;
- Kamer met constante temperatuur en/of waterbad van 25 °C ± 1 °C of beter;
- Membranfiltratie-eenheid (facultatief);
- Koolstof-analysator (facultatief).

VII.2.2. Bereiding van anorganisch medium

De volgende voorraadoplossingen worden uitgaande van reagentia van analytische kwaliteit en water (I.6.1.) bereid:

(a)	Monokaliumdiwaterstorthofosfaat, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikaliummonowaterstorthofosfaat, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinatriummonowaterstorthofosfaat-dodecahydraat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	44,60 g
	Ammoniumchloride, NH_4Cl	1,70 g

Deze stoffen worden in water opgelost en de oplossing wordt tot 1 liter aangevuld.

De pH-waarde van de oplossing dient 7,2 te zijn.

(b)	Magnesiumsulfaat-heptahydraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld.	
(c)	Calciumchloride, watervrij, CaCl_2	27,50 g
	wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld	
(d)	Ijzer(III)chloride-hexahydraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	wordt in water opgelost en tot 1 liter aangevuld	

Van elke oplossing (a), (b), (c) en (d) wordt 3 ml genomen en er wordt tot 1 liter aangevuld.

VII.2.3. Bereiding van entmateriaal

Verse monsters worden verzameld op niet minder dan 10 lokaties, voornamelijk in gebieden waar uiteenlopende chemicaliën worden gebruikt en geloosd. Van plaatsen zoals rioolwaterzuiveringsinstallaties, behandelingsinstallaties voor industrieel afvalwater, rivieren, plassen en zeeën worden monsters van 1 liter slib, oppervlaktebodem, water e.d. verzameld en grondig dooreen gemengd. Na verwijdering van drijvend materiaal en bezinking wordt de bovenstaande vloeistof met natriumhydroxyde of fosforzuur op pH 7 ± 1 gebracht.

Van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof wordt een voldoende volume genomen voor het vullen van een actief-slib-tank van het vul-en-loop-type en de vloeistof wordt ongeveer 23,5 uur belucht. Dertig minuten na beëindigen van de beluchting wordt ongeveer eenderde van het gehele volume van de bovenstaande vloeistof verwijderd en wordt een gelijk volume van een oplossing (pH 7) die telkens 0,1% glucose, pepton en monokaliumorthofosfaat bevat aan het bezonken materiaal toegevoegd waarna de beluchting wordt hervat. Deze procedure wordt eenmaal per dag herhaald. De slibeenheid dient volgens een verantwoorde praktijk te worden gebruikt: effluenten moeten helder zijn, de temperatuur bedraagt 25 ± 2 °C, de pH 7 ± 1 , slib bezinkt goed, er is voldoende beluchting om het mengsel te allen tijde aëroob te houden, er zijn protozoën aanwezig en de activiteit van het slib wordt ten minste elke drie maanden ten opzichte van een referentiestof getest. Het slib wordt niet eerder als entmateriaal gebruikt dan na een werking van ten minste één maand, maar ook niet meer dan na vier maanden. Daarna wordt op gezette tijden, elke drie maanden, een monster van ten minste 10 lokaties genomen.

Teneinde vers en oud slib op dezelfde activiteit te houden wordt de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een in gebruik zijnd actief slib gemengd met een gelijk volume van de gefiltreerde bovenstaande vloeistof van een vers uit tien bronnen verzameld mengsel en wordt de verenigde vloeistof als boven gekweekt. 18-24 uur nadat de eenheid is gevoed wordt slib als entmateriaal genomen.

VII.2.4. Bereiding van de proefoplossingen

De volgende zes kolven worden bereid:

Nr. 1: teststof in verdunningswater, 100 mg/l

Nr. 2, 3 en 4: teststof in anorganisch medium, 100 mg/l

Nr. 5: referentiestof (b.v. aniline) in anorganische medium, 100 mg/l

Nr. 6: alleen anorganisch medium

Slecht oplosbare teststoffen worden rechtstreeks op basis van gewicht of volume toegevoegd of behandeld als beschreven in Bijlage III, met dien verstande dat er geen oplosmiddelen of emulgeermiddelen worden gebruikt. In alle kolven wordt in daarvoor bestemde kommetjes absorptiemiddel voor CO_2 gebracht. De pH in de kolven nrs. 2, 3 en 4 wordt op 7,0 ingesteld.

VII.2.5. Uitvoering van de test

De kolven nrs. 2, 3 en 4 (testsuspensies), nr. 5 (activiteitscontrole) en nr. 6 (entmateriaal-blanco) worden geënt met een klein volume entmateriaal tot een concentratie van 30 mg/l gesuspendeerde vaste stof. Aan de kolf 1, die dient als niet-biologische controle, wordt geen entmateriaal toegevoegd. De apparatuur wordt gemonteerd, de luchtdichtheid wordt gecontroleerd, de roerders worden aangezet en de meting van de zuurstofopname in het donker wordt begonnen. De temperatuur, de roerder en het coulometrische registratie-apparaat voor zuurstofopname worden dagelijks gecontroleerd en eventuele kleurverandering van de inhoud van de kolven wordt genoteerd. De opgenomen hoeveelheid zuurstof voor de zes kolven wordt rechtstreeks, met een geschikte methode afgelezen, b.v. van het zes-punts papierregistratie-apparaat, waaruit een BOD-kromme voortkomt. Aan het eind van de incubatie, gewoonlijk 28 dagen, wordt de pH van de inhoud van de kolven gemeten en worden de concentraties van de resterende teststof en van eventueel tussenprodukt en, in geval van wateroplosbare teststof, de concentratie DOC bepaald (Bijlage II.4). In geval van vluchtige stoffen wordt bijzondere zorgvuldigheid betracht. Indien nitrificatie wordt verwacht, worden zo mogelijk de nitraat- en nitrietconcentratie bepaald.

VII.3. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

VII.3.1. Verwerking van de resultaten

De door de teststof na een gegeven tijdsduur opgenomen hoeveelheid zuurstof (mg), die is gecorrigeerd voor de door de blanco-controle van het entmateriaal in dezelfde tijd opgenomen hoeveelheid, wordt gedeeld door het gewicht van de gebruikte teststof. Dit geeft het BOD, uitgedrukt als mg zuurstof/mg teststof, d.w.z. :

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ opname door teststof} - \text{mg O}_2 \text{ opname door blanco}}{\text{mg teststof in kolf}}$$

$$= \text{mg O}_2/\text{mg teststof}.$$

Het percentage biologische afbraak wordt dan verkregen uit :

$$\% \text{ biologische afbraak} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2/\text{mg stof)}}{\text{ThOD (mg O}_2/\text{mg stof)}} \times 100$$

Voor mengsels wordt het ThOD berekend uit elementairanalyse, net als voor een eenvoudige verbinding. Al naar gelang nitrificatie afwezig danwel volledig is (Bijlage II.2) wordt het bijbehorende ThOD (ThOD_{NH4} of ThOD_{NO3}) gebruikt. Indien echter nitrificatie optreedt maar niet volledig is, wordt een correctie aangebracht voor de door nitrificatie verbruikte hoeveelheid zuurstof die is berekend uit de veranderingen in concentraties nitriet en nitraat (Bijlage V).

Het percentage primaire biologische afbraak wordt berekend uit het verlies aan specifieke (moeder)stof (zie I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Indien er in kolf nr. 1, waar fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, een verlies aan teststof is geweest, wordt dit gerapporteerd en wordt de concentratie teststof (S_b) na 28 dagen in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Wanneer bepalingen van de DOC worden uitgevoerd (naar keuze), wordt het percentage uiteindelijke biologische afbraak berekend uit:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

zoals beschreven onder punt 1.7.1. Als er verlies aan DOC in kolf nr. 1, waarin fysisch-chemische verwijdering wordt gemeten, is geweest, wordt de DOC-concentratie in deze kolf gebruikt voor het berekenen van het percentage biologische afbraak.

Alle resultaten worden op de bijgaande gegevensformulieren geregistreerd.

VII.3.2. Geldigheid van de resultaten

De zuurstofopname door de entmateriaal-blanco bedraagt normaal 20-30 mg O₂/l en mag over 28 dagen niet meer zijn dan 60 mg/l. Hogere waarden dan 60 mg/l betekenen dat de gegevens en experimentele technieken moeten worden getoetst. Indien de pH-waarde buiten het gebied van een 6-8,5 ligt en het zuurstofverbruik door de teststof minder dan 60 % bedraagt, dient de test met een lagere concentratie teststof te worden herhaald.

Zie ook I.5.2.

Indien het percentage afbraak van aniline dat is berekend uit het zuurstofgebruik na 7 dagen niet meer dan 40 % en na 14 dagen niet meer dan 65 % bedraagt, wordt de test als ongeldig beschouwd.

VII.3.3. Rapportage

Zie 1.8.

VII.4. GEGEVENSFORMULIER

Hieronder volgt een voorbeeld van een gegevensformulier

MITI (I) TEST

1. LABORATORIUM

2. DATUM AAN HET BEGIN VAN DE TEST

3. TESTSTOF

Naam :

Concentratie voorraadoplossing : mg/l als teststof

Beginconcentratie in het milieu, C_o : mg/l als teststof

Volume reactiemengsel, V : ml

ThOD :... mg O₂/l

4. ENTMATERIAAL

Verzamelingplaatsen van slib :

- | | |
|-------|--------|
| 1)... | 6)... |
| 2)... | 7)... |
| 3)... | 8)... |
| 4)... | 9)... |
| 5)... | 10)... |

Concentratie gesuspendeerde vaste stof in actief slib na acclimatisering met synthetisch rioolwater =...mg/l

Volume actief slib per liter eindmedium =...ml

Concentratie slib in eindmedium =... mg/l

5. ZUURSTOFOPNAME : BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID

Gebruikt type respirometer :

		Tijd (dagen)				
		0	7	14	21	28
O ₂ opname (mg) teststof	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
O ₂ opname (mg) blanco	b					
Gecorrigeerde O ₂ opname (mg)	(a ₁ - b) (a ₂ - b) (a ₃ - b)					
BOD per mg teststof	$\frac{(a-b)}{C_0V}$	Kolf 1				
		Kolf 2				
		Kolf 3				
% afbraak $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1				
		2				
		3				
		Gem. (*)				

N.B.: Soortgelijke schema's kunnen worden gebruikt voor de referentie-stof en de toxiciteitscontroles.

(*) Indien D₁ en D₂ te veel van elkaar verschillen, moet het gemiddelde niet berekend worden.

6. KOOLSTOFANALYSE (facultatief)

Koolstofanalyse-apparaat: . . .

Kolf	DOC			%DOC verwijd.	Gemiddelde
	Gemeten		Gecorrig		
Water + teststof	a			—	—
Slib + teststof	b1		b1 - c		
Slib + teststof	b2		b2 - c		
Slib + teststof	b3		b3 - c		
Blancocontrole	c		—	—	—

$$\% \text{ DOC verwijderd: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. GEGEVENS UIT DE SPECIFIEKE CHEMISCHE ANALYSE

	Resthoeveelheid teststof bij einde test	% afbraak
blancotest met water	S _b	
geënt medium	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ afbraak} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Berekend wordt het % afbraak, respectievelijk voor kolven a₁, a₂ en a₃.

8. OPMERKING

De kromme van het BOD tegen de tijd wordt, indien beschikbaar, bijgevoegd.

BIJLAGE I

AFKORTINGEN EN DEFINITIES

DO : Opgeloste zuurstof (mg/l) is de concentratie zuurstof die is opgelost in een waterig medium.

BOD : (BZV), biochemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die door micro-organismen wordt verbruikt bij het metaboliseren van een test- verbinding; wordt ook uitgedrukt als g zuurstofopname per g testverbinding (zie methode C.5).

COD : (CZV), chemisch zuurstofverbruik (g) is de hoeveelheid zuurstof die tijdens oxydatie van een testverbinding met warm, zuur dichromaat wordt verbruikt; het biedt een maat van de aanwezige hoeveelheid oxydeerbaar materiaal; wordt ook uitgedrukt als g zuurstof verbruikt per g testverbinding (zie methode C.6).

DOC : Opgeloste organische koolstof is de organische koolstof die in de oplossing aanwezig is of die of door een filter van 0,45 micrometer gaat of na centrifugeren bij 40 000 m.s⁻² (\pm 4 000 g) gedurende 15 min., in de vloeistof blijft.

ThOD : Theoretisch zuurstofverbruik (mg) is de totale hoeveelheid zuurstof die nodig is om een chemische stof volledig te oxyderen; het wordt berekend op basis van de molecuulformule (zie Bijlage II.2) en wordt ook uitgedrukt als mg zuurstof die nodig is per mg testverbinding.

ThCO₂ : Theoretische hoeveelheid kooldioxyde (mg) is de hoeveelheid kooldioxyde die volgens berekening uit het bekende of gemeten koolstof gehalte van de testverbinding wordt geproduceerd, wanneer deze volledig wordt gemineraliseerd; wordt ook uitgedrukt als mg kooldioxyde ontwikkeld per mg testverbinding.

TOC : Totale organische koolstof van een monster is de som van de hoeveelheid organische koolstof in oplossing en in suspensie.

IC : Anorganische koolstof.

TC : Totale koolstof is de som van de in een monster aanwezige organische en anorganische koolstof.

Primaire biologische afbraak :

is de wijziging in de chemische structuur van een stof als gevolg van een biologisch proces, hetgeen leidt tot verlies van een bepaalde eigenschap van de stof.

Uiteindelijke biologische afbraak (aëroob) :

is de mate van afbraak die wordt verkregen wanneer de testverbinding volledig door micro-organismen wordt omgezet tot kooldioxyde, water, anorganische zouten en nieuwe microbiële celbestanddelen (biomassa).

Gemakkelijk biologisch afbreekbaar :

een arbitraire indeling van chemische stoffen die bepaalde schiftingsproeven op uiteindelijke biologische afbreekbaarheid hebben doorstaan; deze proeven zijn zo streng dat geacht wordt dat dergelijke verbindingen in aquatisch milieu onder aërobe omstandigheden snel en volledig biologisch worden afgebroken.

Inherent biologisch afbreekbaar :

een indeling van chemische stoffen waarvoor welke erkende proef op biologische afbreekbaarheid dan ook een ondubbelzinnig bewijs van biologische afbraak (primair of uiteindelijk) levert.

Behandelbaarheid :

is de geschiktheid van verbindingen tot verwijdering gedurende biologische afvalwaterbehandeling zonder nadelige invloed op de normale werking van de behandelingsprocessen. In het algemeen zijn gemakkelijk biologische afbreekbare verbindingen behandelbaar, maar geldt dat niet voor alle inherent biologisch afbreekbare verbindingen. Niet-biologische processen kunnen ook optreden.

Aanlooptijd

is de duur vanaf de enting in een afvlakkingstest, totdat het percentage afbraak tot ten minste 10 % is gestegen. De aanlooptijd is vaak sterk variabel en slecht reproduceerbaar.

Afbraaktijd

is de tijd van het eind van de aanlooptijd tot het tijdstip dat 90 % van de maximale afbraak is bereikt.

10-dagen venster

is de periode van 10 dagen onmiddellijk na het bereiken van 10 % afbraak.

BIJLAGE II

BEREKENING EN BEPALING VAN GESCHIKTE TOTAAL PARAMETERS

Afhankelijk van de gekozen methode zijn bepaalde totaalparameters nodig. In dit gedeelte wordt de herleiding van deze waarden beschreven. Het gebruik van deze parameters wordt bij de afzonderlijke methoden beschreven.

1. Koolstof gehalte

Het koolstof gehalte wordt berekend uit de bekende elementaire samenstelling of bepaald aan de hand van elementaire analyse van de teststof.

2. Theoretisch zuurstofverbruik (ThOD)

Het theoretische zuurstofverbruik (ThOD) kan worden berekend indien de elementaire samenstelling bekend is of door elementaire analyse is bepaald. Voor de verbinding met samenstelling :



is dit zonder nitrificatie,

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16 (2c + 1/2 (h - cl - 3n) + 3s + 5/2 p + 1/2 na - o)}{MW} \text{ mg/mg}$$

of met nitrificatie,

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16 (2c + 1/2 (h - cl) + 5/2 n + 3s + 5/2 p + 1/2 na - o)}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Chemisch zuurstofverbruik (COD)

Het chemisch zuurstofverbruik (COD) wordt bepaald volgens methode C.6.

4. Opgeloste organische koolstof (DOC)

Opgeloste organische koolstof (DOC) is per definitie de organische koolstof van een chemische stof of een mengsel in water dat door een filter van 0,45 micrometer gaat.

Uit de testvaten worden monsters getrokken en deze worden onmiddellijk met een geschikt membraanfilter in het filtreerapparaat gefiltreerd. De eerste 20 ml (bij gebruik van kleine filters kan deze hoeveelheid worden verminderd) van het filtraat wordt verwijderd. Hoeveelheden van 10-20 ml, of minder in geval van injectie (volume afhankelijk van de voor de koolstof analyser benodigde hoeveelheid), worden apart gehouden voor koolstof analyse. De DOC-concentratie wordt bepaald met behulp van een analyse-apparaat voor organische koolstof, waarmee een koolstofconcentratie die overeenkomt met of kleiner is dan 10 % van de oorspronkelijke, in de test gebruikte DOC-concentratie nauwkeurig kan worden gemeten.

Gefiltreerde monsters die niet op dezelfde werkdag kunnen worden geanalyseerd kunnen worden bewaard, gedurende 48 uur in een koelkast bij 2-4 °C, of gedurende langere tijden beneden - 18°C.

Opmerkingen :

Membranfilters zijn met het oog op hydrofilisering vaak geïmpregneerd met oppervlakte-actieve stoffen. Een dergelijk filter kan derhalve enkele mg oplosbare organische koolstof bevatten die kunnen storen bij de bepalingen van de biologische afbreekbaarheid. Oppervlakte-actieve stoffen en andere oplosbare organische verbindingen worden uit de filters verwijderd doordat deze driemaal telkens een uur in gedeïoniseerd water worden uitgekookt. De filters kunnen dan gedurende een week in water worden bewaard. Indien er eenmalige filterpatronen worden gebruikt, moet elke partij worden gecontroleerd op het niet-afgeven van oplosbare organische koolstof.

Afhankelijk van het type membraanfilter kan de teststof door adsorptie worden vastgehouden. Het kan daarom raadzaam zijn na te gaan dat de teststof niet door het filter wordt vastgehouden.

Centrifugeren bij 40 000 m.sec⁻² (4 000 g) gedurende 15 min. kan worden toegepast in plaats van filtratie, voor het onderscheid tussen TOC en DOC. Bij een beginconcentratie van < 10 mg DOC/l is in deze methode niet betrouwbaar, omdat dan niet alle bacteriën worden verwijderd of koolstof als deel van het bacteriële plasma opnieuw in oplossing gaat.

LITERATUUR

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, P 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summatische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NÄW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol 13 (1), 169.

BIJLAGE III

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN SLECHT OPLOSBAAR STOFFEN

Bij tests op de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare stoffen dient aan de volgende aspecten bijzondere aandacht te worden geschonken.

Terwijl homogene vloeistoffen zelden bemonsteringsproblemen opleveren, verdient het aanbeveling dat vaste stoffen op geschikte wijze worden gehomogeniseerd opdat fouten als gevolg van het niet-homogeen zijn worden voorkomen. Bijzondere nauwkeurigheid moet worden betracht wanneer representatieve monsters van een aantal milligrammen uit mengsels van chemicaliën of stoffen met grote hoeveelheden verontreinigingen nodig zijn.

Tijdens de tests kunnen uiteenlopende vormen van doorenmenging worden toegepast. Er moet op worden gelet dat er slechts voldoende wordt geroerd om de stof gedispergeerd te houden, en dat er geen oververhitting, overmatige schuimvorming of overmatige afschuifkrachten optreden.

Er kan een emulgator worden gebruikt die een stabiele dispersie van de stof geeft. Deze dient niet giftig te zijn voor bacteriën en mag niet biologisch worden afgebroken of onder de testomstandigheden schuimvorming veroorzaken.

Dezelfde criteria zijn zowel op oplosmiddelen als op de emulgatoren van toepassing.

Het gebruik van vaste dragers wordt voor vaste teststoffen niet aanbevolen, maar zij kunnen wel geschikt zijn voor olieachtige stoffen.

Wanneer hulpstoffen zoals emulgatoren, oplosmiddelen en dragers worden gebruikt, dient een blanco-proef waarin de hulpstof aanwezig is te worden uitgevoerd.

De drie respirometrische tests CO₂, BOD en MITI kunnen alle worden gebruikt voor het bestuderen van de biologische afbreekbaarheid van slecht oplosbare verbindingen.

LITERATUUR

- de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol 16, 833.
- Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol 13, 169.

BIJLAGE IV

BEOORDELING VAN DE BIOLOGISCHE AFBREEKBAARHEID VAN STOFFEN DIE VAN GIFTIGHEID VOOR HET ENTMATERIAAL WORDEN VERDACHT

Wanneer een chemische stof wordt onderworpen aan onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid en niet biologisch afbreekbaar blijkt te zijn, wordt de volgende procedure aanbevolen indien onderscheid tussen remming en inerteit wordt gewenst (Reynolds et al., 1987).

Voor de toxiciteitsproef en de biologische afbraakproef moet hetzelfde of een soortgelijk entmateriaal worden gebruikt.

Voor het bepalen van de toxiciteit van chemicaliën die in tests op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden onderzocht komt de toepassing van de remming van de slibademhalingssnelheid (test op de remming van de ademhaling van actief slib—Richtlijn 88/302/EEG), BOD en/of groeiremming of een combinatie daarvan in aanmerking.

Indien remming als gevolg van giftigheid moet worden voorkomen, kan het aanbeveling verdienen dat de concentraties teststof die in het onderzoek op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid worden gebruikt minder dan 1/10 van de EC₅₀-waarden (of minder dan de EC₂₀-waarden) die zijn verkregen bij de toxiciteitstest bedragen. Verbindingen met een EC₅₀-waarde van meer dan 300 mg/l hebben waarschijnlijk geen toxische effecten bij het onderzoek op gemakkelijke biologische afbreekbaarheid.

EC₅₀-waarden van minder dan 20 mg/l geven waarschijnlijk wel ernstige problemen bij het navolgende onderzoek. Er dienen dan lage testconcentraties te worden toegepast en gebruik dient dan te worden gemaakt van de strenge en gevoelige gesloten-flesproef of van met ¹⁴C gemerkt materiaal. Anderzijds kunnen met een geacclimatiseerd entmateriaal hogere concentraties teststof worden gebruikt. In het laatste geval gaat echter het specifieke criterium van de test op de gemakkelijke biologische afbreekbaarheid verloren.

LITERATUUR

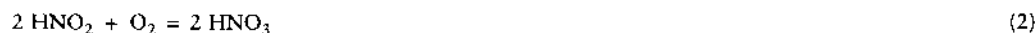
- Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol 16, 2259.

BIJLAGE V

CORRECTIE VAN ZUURSTOFOPNAME VOOR HET OPTREDEN VAN NITRIFICATIE

Fouten die het gevolg zijn van het niet in aanmerking nemen van nitrificatie bij de bepaling door middel van de zuurstofopname van de biologische afbreekbaarheid van teststoffen die geen stikstof bevatten zijn zeer gering (niet meer dan 5 %), zelfs indien oxydatie van de ammonium-N in het medium ongeregeld voorkomt tussen test- en blancovaten. Bij teststoffen die stikstof bevatten kunnen echter aanzienlijke fouten ontstaan.

Indien nitrificatie is opgetreden maar niet volledig is, kan de waargenomen zuurstofopname door het reactiemengsel worden gecorrigeerd voor de hoeveelheid zuurstof die is gebruikt voor het oxyderen van ammonium tot nitriet en nitraat, indien de veranderingen in de concentratie tijdens incubatie van nitriet en nitraat worden bepaald met inachtneming van de volgende vergelijkingen:



Totaal:



Uit vergelijking (1) volgt dat de zuurstofopname door 28 g stikstof in ammoniumchloride (NH_4Cl) die wordt geoxydeerd tot nitriet 96 g bedraagt, d.w.z. een factor van 3,43 (96/28). Op dezelfde wijze volgt uit vergelijking (3) dat de zuurstofopname door 28 g stikstof bij oxydatie tot nitraat 128 g bedraagt, d.w.z. een factor 4,57 (128/28).

Aangezien de reacties *na* elkaar verlopen, en worden bewerkstelligd door afzonderlijke en verschillende bacteriesoorten, is het mogelijk dat de concentratie nitriet toeneemt of afneemt, in het laatste geval zal een overeenkomstige concentratie nitraat worden gevormd. De bij de vorming van nitraat verbruikte hoeveelheid zuurstof bedraagt dus 4,57 maal de toename van de nitraatconcentratie, terwijl de hoeveelheid zuurstof die samenhangt met de vorming van nitriet 3,43 maal de toename van de nitrietconcentratie is of bij afname van de concentratie het zuurstof-verlies $-3,43$ is maal de afname in de concentratie.

Dus:

$$\text{O}_2 \text{ verbruikt bij nitraatvorming} = 4,57 \times \text{toename N-nitraatconcentratie} \quad (4)$$

en

$$\text{O}_2 \text{ verbruikt bij nitrietvorming} = 3,43 \times \text{toename N-nitrietconcentratie} \quad (5)$$

en

$$\text{O}_2 \text{ verloren bij verdwijning nitriet} = -3,43 \times \text{afname N-nitrietconcentratie} \quad (6)$$

zodat

$$\text{O}_2\text{-opname als gevolg van nitrificatie} = \pm 3,43 \times \text{wijziging in N-nitrietconcentratie} + 4,57 \times \text{toename N-nitraatconcentratie} \quad (7)$$

en dus

$$\text{O}_2\text{-opname als gevolg van C-oxydatie} = \text{totaal waargenomen opname} - \text{opname als gevolg van nitrificatie} \quad (8)$$

Anderzijds kan, indien alleen totaal geoxydeerde N wordt bepaald, de zuurstofopname als gevolg van nitrificatie in eerste benadering worden gesteld op $4,57 \times$ toename van geoxydeerde N.

De correctiewaarde voor zuurstofverbruik als gevolg van C-oxydatie wordt vervolgens vergeleken met $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$, zoals berekend in Bijlage II.

C.5. AFBRAAK—BIOCHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de proef is de meting van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV) van vaste of vloeibare organische stoffen.

De gegevens die in deze test zijn verwerkt, hebben betrekking op in water oplosbare verbindingen; vluchtige verbindingen en verbindingen die slechts in geringe mate in water oplosbaar zijn, kunnen echter in principe ook worden getest.

De methode is alleen van toepassing op die organische teststoffen die bij de in de test gebruikte concentratie niet remmend werken op bacteriën. Als de teststof niet oplosbaar is bij de te onderzoeken concentratie, kunnen speciale maatregelen zoals de toepassing van ultrasone dispersie nodig zijn om de teststof goed te dispergeren.

Gegevens over de toxiciteit van de stof kunnen van nut zijn bij de interpretatie van lage gevonden waarden en bij de keuze van geschikte concentraties.

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het BZV is gedefinieerd als de massa opgeloste zuurstof die onder voorgeschreven omstandigheden nodig is voor de biochemische oxydatie van een bepaald volume van een oplossing van de stof.

De resultaten worden weergegeven als g BZV per g geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het gebruik van referentiestoffen om de activiteit van het inoculum te controleren, is wenselijk.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een van tevoren bepaalde hoeveelheid van de stof wordt opgelost of gedispergeerd in een geschikt, goed belucht medium, geënt met micro-organismen en bij een constante vastgestelde omgevingstemperatuur in het donker geïncubeerd.

Het BZV wordt bepaald door het verschil in de hoeveelheid opgeloste zuurstof bij het begin en bij het einde van de test. De testduur mag niet minder dan 5 dagen en niet meer dan 28 dagen bedragen.

Parallel wordt een blanco proef uitgevoerd zonder teststof.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

De bepaling van het BZV geldt niet zonder meer als bepaling van de biologische afbreekbaarheid van de stof. Deze test is alleen te beschouwen als oriënterende proef.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Eerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid om een BZV-concentratie te verkrijgen die verenigbaar is met de gebruikte methode. Vervolgens wordt het BZV bepaald volgens een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Het BZV van de oplossing wordt berekend volgens de gekozen genormaliseerde methode en herleid naar gram BZV per gram teststof.

3. RAPPORTAGE

De gebruikte methode moet worden vermeld.

Het biochemisch zuurstofverbruik moet het gemiddelde zijn van ten minste drie geldige metingen.

Alle informatie en opmerkingen die van belang kunnen zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, vooral wat betreft verontreinigingen, fysische toestand, toxische effecten en de oorspronkelijke samenstelling van de stof welke van invloed zouden kunnen zijn op de resultaten.

Indien een stof is toegevoegd om de biologische nitrificatie te remmen, moet dit worden vermeld.

4. LITERATUUR

Lijst van genormaliseerde methoden, bij voorbeeld :

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, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815 : Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. AFBRAAK—CHEMISCH ZUURSTOFVERBRUIK

1. METHODE

1.1. INLEIDING

Het doel van de methode is de meting van het chemisch zuurstofverbruik (CZV) van vaste en vloeibare organische stoffen onder vaste laboratoriumomstandigheden op een genormaliseerde manier, die identiek is voor alle organische stoffen.

Informatie betreffende de formules van de stof is nuttig voor de uitvoering van deze test en de interpretatie van de resultaten (bij voorbeeld halogeenzouten, ijzer(II)zouten van organische verbindingen, organochloorverbindingen).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Het chemisch zuurstofverbruik is een maat voor de oxydeerbaarheid van een stof, uitgedrukt als de door de stof onder vaste laboratoriumomstandigheden verbruikte equivalente hoeveelheid zuurstof van een oxyderend reagens.

Het resultaat wordt uitgedrukt in gram CZV per gram geteste stof.

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Het is niet altijd nodig om bij het onderzoek van een nieuwe stof referentiestoffen te gebruiken. Deze zijn in de eerste plaats bedoeld om zo nu en dan de methode te ijken en om de resultaten te kunnen vergelijken als een andere methode wordt gebruikt.

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

Een bekende in water opgeloste of gedispergeerde hoeveelheid van de stof wordt geoxydeerd met kaliumdichromaat in sterk zwavelzuur met zilversulfaat als katalysator; deze laat men gedurende 2 uur "refluxen". Het resterende dichromaat wordt bepaald door titratie met gestandaardiseerd ijzer(II) ammoniumsulfaat.

Bij chloorhoudende stoffen wordt kwik(II)sulfaat (*) toegevoegd om de storing door chloride te verminderen.

1.5. KWALITEITSCRITEIA

Aangezien de bepaling identiek is voor alle organische stoffen, is de CZV-waarde een „oxydeerbaarheidsindicator" en wordt als zodanig gebruikt als een praktische methode om de hoeveelheid organische stof te meten.

Deze test kan worden gestoord door chloride; ook kan de CZV-bepaling worden gestoord door anorganische reducerende of oxyderende agentia.

Enkele cyclische verbindingen en vele vluchtige stoffen (bij voorbeeld lagere vetzuren) worden niet volledig geoxydeerd in deze test.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

Allereerst wordt een oplossing of dispersie van de stof bereid met een CZV tussen 250 en 600 mg/l.

"Opmerkingen".

Van slecht oplosbare en niet-dispergeerbare stoffen kan een hoeveelheid fijn verpulverde stof of een hoeveelheid vloeistof worden afgewogen die overeenkomt met ongeveer 5 mg CZV. Dit wordt met water in de opstelling voor het experiment gebracht.

Het CZV wordt vaak, en speciaal bij moeilijk oplosbare stoffen, beter bepaald met een variant van de methode, bij voorbeeld in een gesloten systeem met drukregulator (H. Kelkenberg, 1975). Met deze wijziging kunnen stoffen die met de conventionele methode slechts moeizaam bepaald kunnen worden—bij voorbeeld azijnzuur—vaak met succes worden gemeten. Ook deze methode faalt echter met pyridine. Indien de kaliumdichromaat-concentratie, zoals beschreven in referentie (1) wordt verhoogd tot 0,25 N (0,0416 M), kan het directe afwegen van 5 tot 10 mg stof vereenvoudigd worden, hetgeen essentieel is voor de CZV-bepaling van slecht in water oplosbare stoffen (referentie (2)).

Anders wordt vervolgens het CZV bepaald aan de hand van een geschikte nationaal of internationaal genormaliseerde methode.

2. GEGEVENS EN EVALUATIE

Het CZV van de inhoud van het testvat wordt berekend aan de hand van de gekozen genormaliseerde methode en omgerekend tot gram CZV per gram geteste stof.

(*) Na gebruik dienen oplossingen die kwikzouten bevatten te worden nabehandeld om verspreiding van kwik in het milieu te voorkomen.

3. RAPPORTAGE

De gehanteerde referentiemethode moet worden vermeld.

Het chemisch zuurstofverbruik moet een gemiddelde van ten minste drie metingen zijn. Alle informatie en opmerkingen die van belang zijn voor de interpretatie van de resultaten moeten worden vermeld, met name wat betreft verontreinigingen, fysische toestand en de oorspronkelijke samenstelling van de stof (indien bekend) die van invloed kunnen zijn op de resultaten.

Het gebruik van kwik(II)sulfaat om de storing door chloride te verminderen, moet worden vermeld.

4. LITERATUUR

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Enkele gestandaardiseerde methoden :

NBN T 91-201 : Determination of the Chemical Oxygen Demand.

ISBN 0 11 7512494 : Chemical Oxygen Demand (Dichromate Value) of Polluted and Waste Waters— 1977.

NF T 90-101 : Determination of the chemical oxygen demand.

DS 217 = Water : Determination of the chemical oxygen demand.

Analysis

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.7. AFBRAAK—NIET-BIOLOGISCHE AFBRAAK : HYDROLYSE IN AFHANKELIJKHEID VAN DE pH

1. METHODE

Deze methode is gebaseerd op de OESO-testrichtlijn (1).

1.1. INLEIDING

Hydrolyse is een belangrijke reactie voor het bepalen van de niet-biologische afbraak. De reactie is vooral van betekenis voor stoffen die biologisch slecht afbreekbaar zijn en kan van invloed zijn op de persistentie van een stof in het milieu.

De meeste hydrolysereacties zijn pseudo-eerste-orde-reacties en daarom zijn de halveringstijden onafhankelijk van de concentratie. Hierdoor kunnen de resultaten van laboratoriumconcentraties worden geëxtrapoleerd naar milieu-omstandigheden.

Bovendien zijn er verscheidene gevallen bekend (zie punt 2) waarin een bevredigende overeenstemming werd gevonden tussen de resultaten in zuiver en in natuurlijk water en wel voor verschillende typen chemicaliën.

Informatie vooraf over de dampspanning van de stof is van nut voor de uitvoering van deze test.

Deze methode is alleen toepasbaar op in water oplosbare stoffen. Verontreinigingen kunnen de resultaten nadelig beïnvloeden.

Het hydrolytisch gedrag van stoffen dient te worden onderzocht bij zuurtegraden die normaal in het milieu voorkomen (pH 4 tot 9).

1.2. DEFINITIES EN EENHEDEN

Hydrolyse is een reactie van een verbinding RX met water, die kan worden weergegeven als de uitwisseling van de groep X tegen OH :



De snelheid waarmee de concentratie van RX afneemt wordt gegeven door:

$$\text{snelheid} = k[\text{H}_2\text{O}][\text{RX}] \quad [2]$$

Omdat water in grote overmaat ten opzichte van de uitgangsverbinding aanwezig is wordt dit reactietype doorgaans beschreven als een *pseudo*-eerste-orde-reactie waarin de waargenomen snelheidsconstante (k_{obs}) wordt gegeven door de volgende vergelijking:

$$k_{\text{obs}} = k[\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Deze constante kan voor een bepaalde pH en temperatuur T worden bepaald met behulp van de formule:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

waarin:

t = tijd;

C_0 = concentratie uitgangsstof op het tijdstip 0;

C_t = concentratie uitgangsstof op het tijdstip t;

2,303 = omrekeningsfactor tussen natuurlijke en Briggse logaritmen.

De concentraties worden uitgedrukt in gram per liter of mol per liter.

Deze constante k_{obs} heeft de dimensie (tijd)⁻¹.

De halveringstijd $t_{\frac{1}{2}}$ is de tijd die nodig is om de concentratie van de teststof met 50 % te verminderen, dat wil zeggen:

$$C_t = \frac{1}{2} \cdot C_0 \quad [5]$$

Combinatie van de formules [4] en [5] levert op:

$$t_{\frac{1}{2}} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3. REFERENTIESTOFFEN

Bij het onderzoeken van een nieuwe stof is het niet in alle gevallen nodig referentiestoffen te gebruiken. Deze stoffen dienen in eerste instantie om van tijd tot tijd te controleren of de methode goed werkt en bieden de mogelijkheid tot vergelijking met de resultaten van een andere methode.

De volgende stoffen zijn als referentiestoffen gebruikt (1) :

Acetylsalicylzuur (Aspirine)

0,0-diethyl-0-1 [6-methyl-2-(1-methylethyl)-pyrimidine-4-yl]thiofosfaat. (Dimpylaat, Diazinon).

1.4. PRINCIPE VAN DE TESTMETHODE

De stof wordt in lage concentratie in water opgelost en de pH en de temperatuur van de oplossing worden gecontroleerd.

De afname van de concentratie van de stof tegen de tijd wordt gevolgd volgens een geschikte analytische methode.

De logaritmen van de concentratie worden uitgezet tegen de tijd en indien de punten een rechte lijn opleveren, wordt de eerste-orde snelheidsconstante verkregen uit de helling van die rechte (zie punt 2).

Als rechtstreekse bepaling van de snelheidsconstante bij een bepaalde temperatuur op moeilijkheden stuit, kan doorgaans een schatting van deze constante worden verkregen met behulp van de Arrhenius vergelijking, die de temperatuurafhankelijkheid van de snelheidsconstante aangeeft. Uit het rechtlijnig verband tussen de logaritme van de bij een aantal temperaturen gemeten snelheidsconstante en de reciproke waarde van de absolute temperatuur (K) kan de waarde van de snelheidsconstante, die niet rechtstreeks meetbaar was, worden geëxtrapoleerd.

1.5. KWALITEITSCRITERIA

Volgens referentie (2) kunnen metingen van hydrolysesnelheidsconstanten van 13 klassen organische verbindingen zeer nauwkeurig zijn.

De herhaalbaarheid is vooral afhankelijk van de beheersing van de pH en de temperatuur en zou beïnvloed kunnen worden door de aanwezigheid van micro-organismen en in speciale gevallen door de concentratie opgeloste zuurstof.

1.6. BESCHRIJVING VAN DE TESTMETHODE

1.6.1. Reagentia

1.6.1.1. Bufferoplossingen

De test wordt uitgevoerd bij drie pH-waarden : 4,0, 7,0 en 9,0.

Hiertoe worden bufferoplossingen bereid met zuivere chemicaliën en gedistilleerd of gedeïoniseerd, steriel water. Het aanhangsel bevat een aantal bruikbare buffersystemen.

De keuze van het buffersysteem kan van invloed zijn op de hydrolysesnelheid; als afwijkingen blijken, moet een alternatief buffersysteem worden gebruikt. In referentie (2) wordt het gebruik van boraat- of acetaatbuffers aanbevolen in plaats van fosfaat.

Indien de pH van een bufferoplossing bij de in de test gebruikte temperatuur niet bekend is, kan deze bij de gekozen temperatuur worden gemeten met een geijkte pH-meter met een nauwkeurigheid van $\pm 0,1$ pH-eenheden.

1.6.1.2. Testoplossingen

De teststof wordt opgelost in de gekozen buffer in een concentratie die niet hoger is dan 0,01 M of niet hoger dan de helft van de verzadigingsconcentratie, naar gelang welke van beide waarden de laagste is.

Het gebruik van met water mengbare, organische oplosmiddelen is alleen raadzaam als de stof slecht in water oplosbaar is.

De hoeveelheid oplosmiddel mag niet meer zijn dan 1% en het hulpoplosmiddel mag het hydrolyseproces niet storen.

1.6.2. Apparatuur

Er wordt gebruik gemaakt van glazen kolven met ingeslepen stop zonder vet op de slijpstukken.

Als de teststof of het buffersysteem vluchtig is of als de test wordt uitgevoerd bij hoge temperatuur, verdienen verzegelde of met een septum afgesloten buizen de voorkeur en moet het gasvolume boven de oplossing zo klein mogelijk zijn.

1.6.3. Analyseprocedure

De methode moet specifiek zijn om bepaling van de teststof in de concentraties van de testoplossingen mogelijk te maken en kan een combinatie van geschikte analysemethoden omvatten.

De gebruikte analyseprocedure is afhankelijk van de aard van de te onderzoeken stof en dient voldoende nauwkeurig en gevoelig te zijn om een afname van de beginconcentratie met 10 % aan te tonen.

1.6.4. Testomstandigheden

De proeven worden uitgevoerd in een thermostatisch geregelde ruimte of in een bad met constante temperatuur op $\pm 0,5$ °C van de gekozen temperatuur. De temperatuur wordt geregeld en gemeten op $\pm 0,1$ °C. Ontleding door licht moet met de daartoe strekkende middelen worden voorkomen.

Bij stoffen die gemakkelijk oxydeerbaar zijn, moet opgeloste zuurstof worden uitgesloten (bij voorbeeld door gedurende 5 minuten stikstof of argon door te leiden alvorens de oplossing te bereiden).

1.6.5. Testprocedure

1.6.5.1. Oriënterende proef

Op alle stoffen moet een oriënterende proef bij $50 \pm 0,5$ °C worden uitgevoerd bij drie pH-waarden : 4,0, 7,0 en 9,0. Hierbij dient een voldoende aantal metingen te worden verricht om te kunnen bepalen of bij elke pH-waarde en bij $50 \pm 0,5$ °C de halveringstijd ($t_{1/2}$) kleiner is dan 2,4 uur dan wel of na 5 dagen minder dan 10 % is gehydrolyseerd. (Dit levert voor een temperatuur die meer met de milieu-omstandigheden overeenkomt (25 °C) geschatte halveringstijden op van respectievelijk korter dan een dag en langer dan één jaar.)

Als uit de oriënterende proef naar voren komt dat bij de drie pH-waarden (4, 7 en 9) binnen 2,4 uur bij $50 \pm 0,5$ °C 50 % of meer van de te onderzoeken stof is gehydrolyseerd dan wel na 5 dagen nog steeds minder dan 10 % is gehydrolyseerd, zijn er geen verdere proeven nodig.

Als het resultaat voor een of meer pH-waarden daar tussenin ligt, wordt test nr. 1 uitgevoerd.

1.6.5.2. Test nr. 1

Test nr. 1 wordt uitgevoerd bij één temperatuur, bij voorkeur bij $50 \pm 0,5$ °C en, zo mogelijk, onder steriele omstandigheden, en wel bij die pH's waarvoor op grond van de oriënterende proef nader onderzoek nodig is.

Er wordt een voldoende aantal monsters (ten minste vier) genomen, dat het gebied tussen 20 % en 70 % hydrolyse bestrijkt; hiermee wordt het pseudo-eerste-ordegedrag bij de bewuste pH-waarden gecontroleerd.

Voor elke pH-waarde waarmee test nr. 1 wordt uitgevoerd, wordt de orde van de reactie vastgesteld.

Schatting van de snelheidsconstante bij 25 °C

Al naar gelang test nr. 1 oplevert dat de reactie pseudo-eerste-orde is of niet, wordt besloten met welke test wordt verder gegaan.

Als op grond van test nr. 1 niet met zekerheid kan worden geconcludeerd dat de reactie pseudo-eerste-orde is, moeten de proeven van test nr. 2 worden uitgevoerd.

Als op grond van test nr. 1 met zekerheid kan worden besloten dat de reactie een eerste-ordeverloop heeft, worden de proeven van test nr. 3 uitgevoerd (onder bijzondere omstandigheden is het wel eens mogelijk de snelheidsconstanten bij 25 °C te berekenen uit de constanten bij 50 °C, berekend aan de hand van de resultaten van test nr. 1 (zie punt 3.2)).

1.6.5.3. Test nr. 2

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH-waarde, waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek, en wel :

— hetzij bij één temperatuur, lager dan 40 °C;

— hetzij bij twee temperaturen, hoger dan 50 °C en met een onderling verschil van ten minste 10 °C.

Bij elke pH-waarde en temperatuur worden in deze test ten minste zes gespreide meetpunten genomen, zodanig dat het gebied tussen 20 en 70 % hydrolyse wordt bestreken.

Voor één pH-waarde en één temperatuur wordt een bepaling in duplo uitgevoerd; wanneer deze test geschiedt bij twee temperaturen boven 50 °C, wordt de duplo bij voorkeur uitgevoerd op de laagste van die twee temperaturen.

Zoveel mogelijk wordt voor elke pH en temperatuur waarbij test nr. 2 wordt uitgevoerd, een grafische schatting gegeven van de halveringstijd ($t_{\frac{1}{2}}$).

1.6.5.4. Test nr. 3

Deze test wordt uitgevoerd bij elke pH waarvoor uit test nr. 1 de noodzaak bleek en wel :

- hetzij bij een temperatuur, lager dan 40 ° C;
- hetzij bij twee temperaturen, hoger dan 50 ° C en met een onderling verschil van ten minste 10 ° C.

Voor elke pH en temperatuur waarbij deze test wordt uitgevoerd, worden drie meetpunten gekozen, het eerste op het tijdstip 0, het tweede en derde bij hydrolysegraden van meer dan 30 %; vervolgens worden de constante k_{obs} en $t_{\frac{1}{2}}$ berekend.

2. GEGEVENSENEVALUATIE

Bij een *pseudo*-eerste-ordegedrag kunnen de waarden van k_{obs} voor elke pH en temperatuur van de test worden verkregen door de logaritme van de concentratie uit te zetten tegen de tijd en gebruik makend van de volgende vergelijking:

$$k_{\text{obs}} = - \text{helling} \times 2,303 \quad [7]$$

Vervolgens kan de $t_{\frac{1}{2}}$ worden berekend met behulp van vergelijking [6].

De $k_{25\text{ °C}}$ kan in voorkomend geval worden berekend met behulp van de Arrhenius-vergelijking.

Voor niet-*pseudo*-eerste-ordegedrag zie punt 3.1.

3. RAPPORTAGE

3.1. VERSLAG VAN DE PROEFNEMINGEN

In het verslag moeten, indien mogelijk, de volgende gegevens worden opgenomen :

- specificatie van de stof;
- resultaten verkregen met referentiestoffen;
- principe en bijzonderheden van de gebruikte analysemethode(n);
- voor elke test : temperatuur, pH-waarde, buffersamenstelling en een tabel met alle concentraties en tijden;
- voor *pseudo*-eerste-ordereacties : de waarden van k_{obs} en $t_{\frac{1}{2}}$ en de berekeningswijze;
- voor niet-*pseudo*-eerste-ordereacties : grafische weergave van de logaritme van de concentratie uitgezet tegen de tijd;
- alle inlichtingen en opmerkingen die voor de interpretatie van de resultaten van belang zijn.

3.2. INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

Soms is het mogelijk een redelijk betrouwbare berekening van de snelheidsconstante (bij 25 °C) van de teststof te maken, mits er reeds experimentele waarden van de activeringsenergie bestaan voor homologen van de teststof en mits redelijkerwijs kan worden aangenomen dat de activeringsenergie van de teststof ongeveer dezelfde grootte heeft.

4. REFERENTIES

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 111. Decision of the Council C(81) 30 Final.

(2) W. Mabey en T. Mill, Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions, J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383-415.

*Aanhangsel***Buffermengsels****A. CLARK EN LUBS**

De pH-waarden in deze tabellen zijn berekend uit potentiaalmetingen met behulp van de standaardvergelijkingen van Sørensen (1909). De werkelijke pH-waarden liggen 0,04 eenheid hoger dan de opgegeven waarden.

Samenstelling	pH
0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N HCl bij 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalaat tot 100 ml	3,8
0,1 M kaliumwaterstofftalaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalaat tot 100 ml	4,2
0,1 M monokaliumfosfaat + 0,1 N NaOH bij 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaat tot 100 ml	7,2

0,1 M boorzuur in 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH bij 20 °C

16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorzuur tot 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF EN VLEESCHOUWER

Samenstelling pH

0,1 M monokaliumcitraat + 0,1 N NaOH bij 18 °C

(kristalletje thymol toevoegen om schimmelgroei te voorkomen)

2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citraat tot 100 ml	4,2

C. SÖRENSEN

Borax (0,05 mol.l⁻¹) + HCl (0,1 mol.l⁻¹)

Samenstelling		pH			
ml 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

Borax (0,05 mol.l⁻¹) + NaOH (0,1 mol.l⁻¹)

Samenstelling		pH			
ml 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

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Annexe V

Méthodes de détermination des propriétés physico-chimiques, de la toxicité et de l'écotoxicité**INTRODUCTION**

La présente annexe expose les méthodes d'essai pour la détermination des propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques énumérées aux annexes VII et VIII du présent arrêté. Ces méthodes ont été établies à partir de protocoles expérimentaux reconnus et recommandés par des organismes internationaux compétents [en particulier l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)].

Lorsque de telles méthodes n'existaient pas, des normes nationales ou des méthodes bénéficiant d'un consensus scientifique ont été retenues. En règle générale, les essais doivent porter sur la substance tel que décrit dans l'arrêté. L'influence que pourraient éventuellement avoir les impuretés sur les résultats des essais 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 la méthode de remplacement qu'il utilise.

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

Parmi diverses méthodes d'essai équivalentes, il faut donner la préférence à celle qui emploie le moins d'animaux.

PARTIE A : METHODES DE DETERMINATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES**A.1. TEMPERATURE DE FUSION/DE CONGELATION****1. METHODE**

La plupart des méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Leurs principes fondamentaux sont décrits dans les références (2) et (3).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes et les appareils décrits ci-après permettent de déterminer la température 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 limitant dépend du fait que la substance peut être facilement ou difficilement pulvérisable ou peut ne pas l'être du tout.

Pour certaines substances, il est préférable de déterminer la température de congélation ou de solidification. C'est pourquoi les normes de ces déterminations figurent également dans cette méthode.

Lorsqu'il est difficile, du fait de certaines propriétés de la substance, de mesurer les paramètres cités ci-dessus, il peut être approprié de rechercher un point d'écoulement.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La température de fusion est définie comme étant la température à laquelle se produit la transition de phase de l'état solide à l'état liquide, à la pression atmosphérique. Idéalement, cette température correspond à la température de congélation.

Etant donné que la transition de phase de nombreuses substances a lieu dans un certain intervalle de température, celle-ci est souvent décrite comme un intervalle de fusion.

Conversion des unités (K en °C)

$$t = T - 273,15$$

t : température Celsius en degrés Celsius (°C)

T : température thermodynamique en Kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre les comparaisons avec les résultats obtenus avec d'autres méthodes.

Certaines substances d'étalonnage sont énumérées dans la référence (4).

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La température (intervalle de température) de la phase de transition de l'état solide, à l'état liquide, ou de l'état liquide à l'état solide, est déterminée. En pratique, les températures du début et de la fin de la fusion/congélation sont déterminées au cours du chauffage/refroidissement, à pression atmosphérique, de la substance à étudier. Cinq types de méthodes sont décrites : la méthode en tube capillaire, la méthode par bloc chauffant, la mesure de la température de congélation, les méthodes d'analyse thermique et la détermination du point d'écoulement (mise au point pour les huiles de pétroles).

Dans certains cas, il peut être commode de mesurer la température de congélation au lieu de la température de fusion.

1.4.1. Méthode du tube capillaire**1.4.1.1. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide**

Une petite quantité de substance finement broyée est placée dans un tube capillaire et tassée avec soin. Le tube est chauffé en même temps qu'un thermomètre dans le bain liquide et l'accroissement de température est ajusté à un peu moins d'1 K/mn pendant la fusion réelle. Les températures correspondant au début et à la fin de la fusion sont relevées.

1.4.1.2. Dispositif de mesure de la température de fusion 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 qui affiche la température d'un 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 bloc chauffant**

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 573 K grâce à un dispositif de lecture de la température comprenant un curseur avec un index et une règle graduée, spécialement conçus pour le banc en question. Pour déterminer une température de fusion, une fine couche de substance est directement déposée sur la surface du banc. En quelques secondes, il se forme une ligne fine de séparation 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 températures 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 de mesure de la température de fusion grâce à un microscope à platine chauffante comporte une enceinte chauffante qui contient une platine métallique 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 la région où se trouve l'échantillon.

Le chauffage de l'échantillon est réglé au moyen d'un rhéostat. Pour effectuer des mesures très précises sur des substances optiquement anisotropes, il est possible d'utiliser de la lumière polarisée.

1.4.2.3. *Méthode du ménisque*

Cette méthode s'applique spécialement aux polyamides.

La température à laquelle se déplace un ménisque d'huile de silicone, emprisonné entre une surface chauffée et une lamelle couvre-objet placée au-dessus de l'échantillon de polyamide à étudier, est déterminée visuellement.

1.4.3. **Méthode de détermination de la température de congélation**

L'échantillon est introduit dans un tube à essai spécial et placé dans un appareil permettant la détermination de la température de congélation. L'échantillon est agité doucement durant tout le refroidissement et la température est relevée à intervalles déterminés. Dès que quelques relevés indiquent une température constante, cette dernière est considérée comme la température de congélation (après correction de l'erreur relative au thermomètre).

Il convient d'éviter un refroidissement trop fort en maintenant un équilibre entre la phase liquide et la phase solide.

1.4.4. **Analyse thermique**

1.4.4.1. *Analyse thermique différentielle (ATD)*

Cette méthode consiste à enregistrer la différence de température entre la substance et la substance de référence en fonction de la température pendant que la substance et la substance de référence sont soumises à un programme contrôlé de variation de température. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, ce changement est indiqué par un mouvement endothermique (fusion) ou exothermique (congélation) sur la ligne de base de l'enregistrement de la température.

1.4.4.2. *Analyse calorimétrique différentielle (ACD)*

Cette technique consiste à soumettre une substance et un produit de référence à un même programme de variation contrôlée de la température et à enregistrer la différence d'énergie absorbée par la substance et par le produit de référence, en fonction de la température. Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour annuler la différence de température entre la substance et le matériel de référence. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (fusion) ou exothermique (congélation) sur la ligne de base de l'enregistrement du flux de chaleur.

1.4.5. **Point d'écoulement**

Cette méthode, mise au point pour les huiles de pétrole, s'applique aux substances huileuses dont la température de fusion est basse.

Après un chauffage préliminaire, l'échantillon est refroidi à une vitesse spécifique et son écoulement est observé à des intervalles de 3 K. La température la plus basse à laquelle on observe un mouvement de la substance est considérée comme le point d'écoulement.

1.5. CRITERES DE QUALITE

L'applicabilité et la précision des différentes méthodes utilisées pour déterminer la température de fusion/intervalle de fusion sont énumérées dans le tableau suivant :

TABLEAU: APPLICABILITÉ DES MÉTHODES

A. Méthodes du tube capillaire

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative ⁽¹⁾	Norme existante
Dispositifs de mesure de la température de fusion comportant un bain de liquide	oui	seulement quelques unes	de 273 à 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Dispositifs de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique	oui	seulement quelques unes	de 293 à 6]573 K	+ 0,5 K	ISO 1218 (E)
Détection photo-élec.	oui	plusieurs avec des dispositifs d'application	de 253 à 573 K	± 0,5 K	

(¹) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance

B. Méthodes utilisant une surface chauffée et méthode de mesure de la température de congélation

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative ⁽¹⁾	Norme existante
Banc chauffant de Kofler	oui	non	de 283 à > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 345176
Microscope à fusion	oui	quelques unes seulement	de 273 à > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Méthode du ménisque	non	spécifique aux polyamides	de 293 à > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (F)
Méthodes de mesure de la température de congélation	oui	oui	de 223 à 573 K	± 0,5 K	par ex. BS 4695

(¹) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance

C. Analyses thermiques

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative ⁽¹⁾	Norme existante
Analyse thermique différentielle	oui	oui	de 173 à 1 273 K	jusqu'à 600 K ± 0,5 K jusqu'à 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Analyse calorimétrique différentielle	oui	oui	de 173 à 1 273 K	jusqu'à 600 K ± 0,5 K jusqu'à 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(¹) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

D. Point d'écoulement

Méthode de mesure	Substances pulvérisables	Substances difficilement pulvérisables	Gamme de températures	Précision approximative ⁽¹⁾	Norme existante
Point d'écoulement	pour les huiles de pétrole et les substances huileuses	pour les huiles de pétrole et les substances huileuses	De 223 à 323 K	± 3,0 K	ASTM D 9766

(¹) Valeur dépendante du type d'instrument et du degré de pureté de la substance.

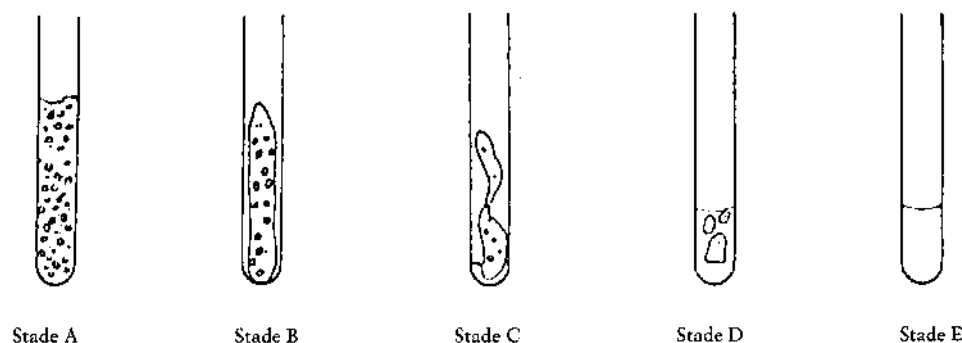
1.6. DESCRIPTION DES METHODES

Les procédures de presque toutes les méthodes d'essai ont été décrites dans des normes internationales et nationales (voir annexe 1).

1.6.1. Méthodes en tube capillaire

Lorsqu'elles sont soumises à une élévation lente de la température, les substances finement pulvérisées montrent habituellement les stades de fusion représentés à la figure 1.

Figure 1



Stade A (début de la fusion) : de fines gouttes adhèrent uniformément à la paroi intérieure du tube capillaire.
 Stade B un espace apparaît entre l'échantillon et la paroi intérieure, en raison de la rétraction du produit en fusion.
 Stade C l'échantillon rétracté commence à s'affaisser et à se liquéfier.
 Stade D un ménisque complet se forme à la surface, mais une partie importante de l'échantillon reste à l'état solide.
 Stade E (fin de la fusion) : il n'y a plus aucune particule solide.

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

1.6.1.1. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide

La figure 2 décrit un type d'appareil de mesure de la température de fusion standardisé (JIS K 0064); l'appareil est en verre et toutes les spécifications sont exprimées en millimètres.

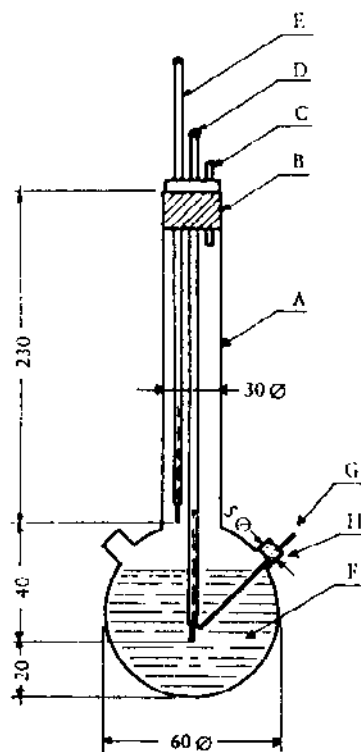


Figure 2

- A: Ballon de mesure
- B: Bouchon
- C: Tube d'aération
- D: Thermomètre
- E: Thermomètre auxiliaire
- F: Bain 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 :

Il convient de choisir un liquide approprié en fonction de la température de fusion à déterminer; on utilisera, par exemple de la paraffine liquide pour des températures de fusion ne dépassant pas 473 K et de l'huile de silicone pour les températures de fusion ne dépassant pas 573 K.

Pour les températures de fusion dépassant 523 K, un mélange composé de trois parties d'acide sulfurique et de deux parties de sulfate de potassium (en rapport de masse) peut être utilisé. Il convient de prendre des précautions appropriées pour utiliser un mélange de ce type.

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 broyée dans un mortier et introduite dans un tube capillaire scellé à une extrémité, la hauteur du remplissage étant fixée à environ 3 mm après tassement. Pour obtenir un échantillon uniformément tassé, il faut laisser tomber le tube capillaire d'une hauteur d'environ 700 mm à l'intérieur d'un tube de verre posé verticalement sur un verre de montre.

Le tube capillaire 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 tube capillaire où se trouve l'échantillon. En général, le tube capillaire est introduit dans l'appareil au moment où le bain est à environ 10 K en dessous de la température de fusion.

Le chauffage du bain est réglé pour que l'accroissement de température soit d'environ 3 K par minute. Le liquide doit être agité. À environ 10 K en dessous de la température de fusion attendue, l'accroissement de température est réglé à un maximum de 1 K par minute.

Calcul :

Le calcul de la température 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.

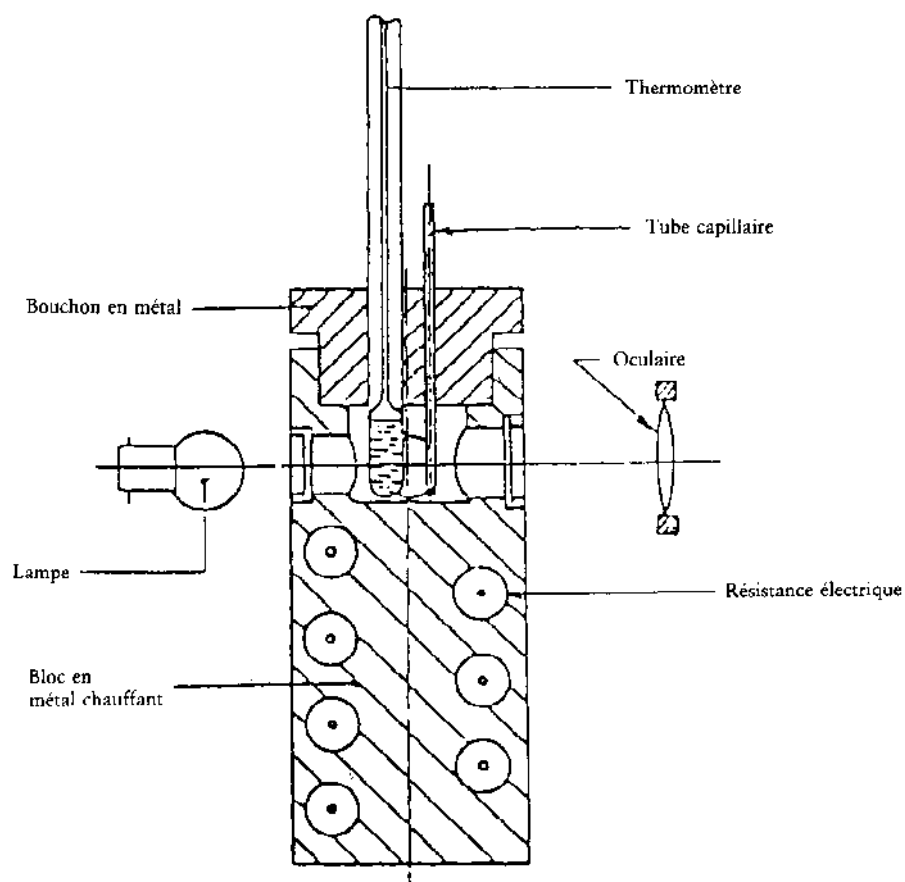
*1.6.1.2. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique**Appareil :**L'appareil comprend :*

- un bloc métallique cylindrique, dont la partie supérieure est creuse et forme une enceinte (voir figure 3);
- un bouchon métallique, percé de deux ou plusieurs trous, permettant l'introduction des tubes dans le bloc métallique;
- 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;
- quatre fenêtres en verre résistant à la chaleur, percées dans les parois latérales de l'enceinte, en position diamétralement opposée. Un oculaire permettant d'observer le tube capillaire est installé en face d'une de ces fenêtres. 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 mentionnées au point 1.6.1.1. Des instruments de mesure thermoélectriques de précision équivalente sont aussi utilisables.

Figure 3

**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 placés dans le four.

Plusieurs programmes d'accroissement linéaire de la température permettent d'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 la température de la substance dans les tubes capillaires.

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

Voir annexe.

1.6.2.2. Microscope à fusion

Voir annexe.

1.6.2.3. Méthode du ménisque. (polyamides)

Voir annexe.

Aux alentours de la température de fusion, l'accroissement de la température doit être inférieur à 1 K/mn.

1.6.3. Méthodes de détermination de la température de congélation.

Voir annexe.

1.6.4. Analyses thermiques**1.6.4.1. Analyse thermique différentielle**

Voir annexe.

1.6.4.2. Analyse calorimétrique différentielle

Voir annexe.

1.6.5. Détermination du point d'écoulement

Voir annexe.

2. DONNEES

La correction du thermomètre s'impose dans *certain*s cas.

3. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- la méthode utilisée;
- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire;
- une estimation de la précision.

La température de fusion indiquée dans le rapport est donnée par la moyenne de deux mesures au moins qui ne dépassent pas les limites de la précision estimée (voir tableau).

Si la différence de température entre le début et la fin de la fusion se trouve dans les limites de précision de la méthode, la température relevée au stade final de la fusion est considérée comme la température de fusion; sinon les deux températures sont indiquées.

Si la substance se décompose ou se sublime avant que la température de fusion soit atteinte, la température à laquelle cela se produit doit être mentionnée.

Toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être mentionnées, en particulier les impuretés et l'état physique de la substance.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 102, Décision du Conseil C(81) 30 Final.
- (2) UIPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803-834.
- (3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
- (4) UICPA, Mesures physico-chimiques : Catalogue de substances de référence pour les laboratoires nationaux, Chimie pure et appliquée., 1976, vol. 48, 505-515.

Annexe

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

1. Méthodes du tube capillaire

1.1. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bain liquide

ASTM E 324-69 Standard test method for relative initial and final melting points and melting range of organic chemicals

BS 4634 Method for the détermination of melting point and/or melting range

DIN 53181 Bestimmung der Schmelzintervalle von Harzen nach Kapillarverfahren

JIS K 00-64 Testing methods for melting point of chemical products.

1.2. Dispositif de mesure de la température de fusion comportant un bloc métallique

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E) Plastics—polyamides—determination of « melting point »

2. Méthodes du bloc chauffant

2.1. Banc chauffant 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 »

ANSI/ASTM D 2133-66 Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

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

3. Méthodes de détermination de la température 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 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de pétrole : détermination de la température de figeage.

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren

NF T 60-114 Point de fusion des paraffines

NF T 20-051 Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point.

4. Analyse thermique

4.1. Analyse thermique différentielle

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Analyse calorimétrique différentielle

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe.

5. Détermination du point d'écoulement

NBN 52014 Echantillonnage et analyse des produits du pétrole : point de trouble et point d'écoulement limite —
 Monsterneming en ontleding van aardolieproducten : Troebelingspunt en vloeipunt
 ASTM D 97-66 Standard test method for pour point of petroleum oils
 ISO 3016 Petroleum oils — Determination of pour point.

A.2. TEMPERATURE D'EBULLITION**1. METHODES**

La plupart des méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Les principes fondamentaux sont décrits dans les références (2) et (3).

1.1. INTRODUCTION

Les méthodes et dispositifs décrits ici peuvent être appliqués aux substances liquides et à température de fusion faible, à condition qu'elles ne subissent pas de réaction chimique en dessous de la température d'ébullition (par exemple auto-oxydation, réarrangement, dégradation, etc.). Les méthodes s'appliquent aux substances liquides pures et impures.

L'importance donnée aux méthodes recourant à la détection photo- électrique et à l'analyse thermique est due au fait que ces méthodes permettent de déterminer non seulement la température de fusion mais également la température d'ébullition. 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 n'est pas nécessaire 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 à l'aide d'un manostat.

Observations :

L'influence des impuretés sur la détermination de la température d'ébullition dépend beaucoup de la nature de l'impureté. Si l'échantillon contient des impuretés volatiles, susceptibles d'avoir une incidence sur les résultats, il convient de purifier la substance.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La température d'ébullition normale est définie comme la température à laquelle la pression de vapeur d'un liquide s'élève à 101,325 kPa.

Si la température d'ébullition n'est pas mesurée à la pression atmosphérique normale, la dépendance de la pression de vapeur vis-à-vis de la température peut être décrite à l'aide de l'équation de Clausius-Clapeyron :

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

où:

p = pression de vapeur de la substance exprimée en pascal

ΔH_v = chaleur de vaporisation en J mol^{-1}

R = constante molaire des gaz parfaits = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = température thermodynamique exprimée en K

La température d'ébullition est établie en tenant compte de la pression ambiante au moment de la mesure.

Conversions

Pression (unité: kPa)

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr
 (l'utilisation des unités «mm Hg» et «Torr» n'est pas permise);

1 atm = atmosphère standard = 101,325 Pa
 (l'utilisation de l'unité «atm» n'est pas permise).

Température (unité : K)

$t = T - 273,15$

t : température Celsius, exprimée en degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

T : température thermodynamique, exprimée en kelvin (K)

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

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 doivent servir en premier lieu à vérifier la fiabilité de la méthode de temps à autre et à permettre la comparaison avec les résultats obtenus à l'aide d'autres méthodes.

Certaines substances d'étalonnage figurent dans les méthodes énumérées dans l'annexe.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Cinq méthodes de détermination de la température d'ébullition (intervalle d'ébullition) sont basées sur la mesure de la température d'ébullition, deux autres sont basées sur une analyse thermique.

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 de la température d'ébullition, ils se prêtent également aux mesures exactes de la température d'ébullition. Un appareil très simple est décrit dans la norme ASTM D 1120-72 (voir annexe). 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 thermomètre approprié placé dans le reflux pendant l'ébullition. La pression peut être modifiée dans cette méthode.

1.4.3. Méthode par distillation à la température 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 essai, qui est immergé dans le liquide contenu dans un bain chauffant. Un capillaire scellé, contenant une bulle d'air dans sa partie inférieure, est plongé dans le tube à essais.

1.4.5. Détection photo-électrique

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

1.4.6. Analyse thermique différentielle

Cette technique permet d'enregistrer la différence de température entre la substance et une substance de référence, en fonction de la température, pendant que la substance et la substance de référence sont soumises au même programme de variation contrôlée de la température. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (ébullition) sur la ligne de base de l'enregistrement de la température.

1.4.7. Analyse calorimétrique différentielle

Cette technique permet d'enregistrer la différence entre l'énergie absorbée par une substance et par un produit de référence, en fonction de la température, alors qu'ils sont soumis au même programme de variation contrôlée de la température. Cette énergie correspond à l'énergie nécessaire pour annuler la différence de température entre la substance et le matériel de référence. Lorsque l'échantillon subit une transition impliquant un changement d'enthalpie, celui-ci est indiqué par un mouvement endothermique (ébullition) sur la ligne de base de l'enregistrement du flux de chaleur.

1.5. CRITERES DE QUALITE

L'applicabilité et la précision des différentes méthodes utilisées pour déterminer la température d'ébullition/intervalle d'ébullition sont indiquées dans le tableau 1.

TABLEAU 1: COMPARAISON DES METHODES

Méthode de mesure	Précision estimée	Norme existante
Ébulliomètre	± 1,4 K (jusqu'à 373 K) (1) (2) ± 2,5 K (jusqu'à 600 K) (1) (2)	ASTM D 1120-72 (1)
Méthode dynamique	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) (2)	
Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)	± 0,5 K (jusqu'à 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Méthode selon Siwoloboff	± 2 K (jusqu'à 600 K) (2)	
Détection photo-électrique	+ 0,3 K (à 373 K) (2)	
Calorimétric	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) ± 2,0 K (jusqu'à 1 273 K)	ASTM E 537-76
Analyse calorimétrique différentielle	± 0,5 K (jusqu'à 600 K) ± 2,0 K (jusqu'à 1 273 K)	ASTM E 537 76
<p>(1) Cette précision n'est valable que pour les 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 les substances pures. Dans le cas contraire, son utilisation doit être justifiée.</p>		

1.6. DESCRIPTION DES METHODES

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

1.6.1. Ébulliomètre

Voir annexe.

1.6.2. Méthode dynamique

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

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

1.6.3. Méthode de distillation (intervalle d'ébullition)

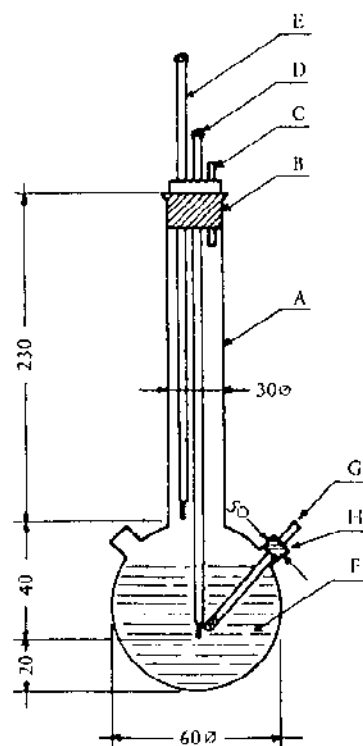
Voir annexe.

1.6.4. Méthode selon Siwoloboff

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

La figure 1 donne un exemple d'appareil normalisé servant à déterminer la température de fusion et la température d'ébullition (JIS K 0064) (l'appareil est en verre et toutes les spécifications sont données en millimètres).

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 (diamètre extérieur de 5 mm au maximum), contenant un tube capillaire, d'environ 100 mm de longueur, 1 mm de diamètre interne et 0,2 à 0,3 mm d'épaisseur de paroi
- H: Tube latéral

Un tube capillaire (capillaire d'ébullition) scellé à environ 1 cm au-dessus de son extrémité inférieure est plongé dans le tube à essais contenant la substance à étudier. La partie scellée du capillaire doit se trouver en dessous de la surface du liquide. Le tube à essai contenant le capillaire doit être attaché au thermomètre avec un élastique ou fixé au moyen d'un support latéral (voir figure 2).

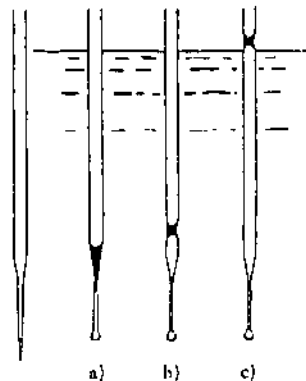
Figure 2

Méthode selon Siwoloboff



Figure 3

Méthode modifiée



Le liquide du bain est choisi en fonction de la température d'ébullition. Pour des températures allant jusqu'à 573 K, on peut utiliser de l'huile de silicone. 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/min. Le liquide du bain doit être agité. À environ 10 K en dessous de la température d'ébullition présumée, 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 s'échapper rapidement du capillaire à l'ébullition.

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

Dans la méthode modifiée (figure 3), la température d'ébullition est déterminée dans un capillaire à température de fusion. L'extrémité 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 servant à déterminer la température de fusion (b), la bulle d'air se dilate. La température 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.

Un faisceau de lumière est envoyé, par les ouvertures aménagées dans le bloc, 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) sans aucune modification de l'appareil. L'instrument doit simplement être placé dans un bain réfrigérant.

1.6.6. Analyse thermique

1.6.6.1. Analyse thermique différentielle

Voir annexe.

1.6.6.2. Analyse calorimétrique différentielle

Voir annexe.

2. DONNEES

Pour de faibles écarts par rapport à la pression normale (maximum ± 5 kPa), les températures d'ébullition peuvent être ramenées à T_n par l'équation de Sidney Young:

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

où:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ [attention au signe]}$$

p = pression barométrique en kPa

f_T = vitesse de variation de la température 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 de calcul des approximations 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 (K)	Facteur de correction f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. RESULTATS

Le procès-verbal d'essais contiendra, si possible, les renseignements suivants :

- la méthode utilisée;
- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire;
- une estimation de la précision.

La température d'ébullition indiquée dans le procès-verbal est la moyenne d'au moins deux mesures qui se situent à l'intérieur des limites de précision estimées (tableau 1).

Les valeurs mesurées des températures d'ébullition ainsi que leurs moyennes doivent être indiquées et la (les) pression(s) auxquelles ont été effectuées les mesures doivent être notées en kPa. La pression doit de préférence être proche de la pression atmosphérique normale.

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

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, ligne directrice n^{os} 103, décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) UICPA, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. *Experimental thermodynamics*, Butterworths, London, 1975, vol. II.
- (3) R. Weissberger ed.: *Technique of organic chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

Annexe

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

1. **Ebulliomètre**

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

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

NF T 20-608 Distillation : détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Analyse thermique différentielle et analyse calorimétrique différentielle**

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definition of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse : Begriffe

A.3. DENSITE RELATIVE

1. METHODE

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Les principes fondamentaux sont décrits dans la référence (2).

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 dans le tableau 1.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La densité relative, D_4^{20} , des solides ou des liquides est le rapport entre la masse d'un volume de substance à tester, 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 masse volumique, ρ , d'une substance est le quotient de la masse, m , par son volume v .

En unités SI, la masse volumique, ρ est exprimée en kg/m^3 .

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE (1) (3)

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Les substances de référence doivent essentiellement servir à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre la comparaison avec les résultats obtenus avec d'autres méthodes.

1.4. PRINCIPE DES METHODES

Quatre types de méthodes sont utilisés.

1.4.1.1. *Aréomètre* (pour les liquides)

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

1.4.1.2. *Balance hydrostatique* (pour les liquides et les solides)

La différence entre le poids d'un échantillon mesuré dans l'air et dans un liquide approprié (par exemple l'eau) peut servir à déterminer sa densité.

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

1.4.1.3. *Méthode du corps immergé* (pour les liquides) (4)

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'un corps de volume connu dans le liquide à étudier.

1.4.2. **Méthodes pycnométriques**

Pour les solides ou les liquides, on peut utiliser des pycnomètres de forme variée 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 dans un gaz inerte est mesuré dans une éprouvette graduée de volume variable. Pour le calcul de la densité, une mesure de masse est effectuée après la mesure du volume.

1.4.4. **Densimètre oscillant** (5) (6) (7)

La densité d'un liquide peut être mesurée à l'aide d'un densimètre oscillant. Un oscillateur mécanique, ayant la forme d'un U, vibre à une fréquence de résonance spécifique qui dépend de sa masse. L'introduction d'un échantillon modifie la fréquence de résonance de l'oscillateur. L'appareil doit être étalonné à l'aide de deux substances liquides de densités connues, choisies de préférence de façon à ce que leurs densités couvrent l'intervalle de mesure.

1.5. CRITERES DE QUALITE

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

1.6. DESCRIPTION DES METHODES

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

Les mesures doivent être réalisées à 20 °C, et au moins en double.

2. **DONNEES**

Voir normes.

3. **RESULTATS**

Le procès-verbal contiendra, si possible, les renseignements suivants :

- la méthode utilisée;
- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, éventuellement, l'étape de purification préliminaire.

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 pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être mentionnées, en particulier en ce qui concerne les impuretés et l'état physique de la substance.

TABLEAU: APPLICABILITE DES METHODES

Méthode de mesure	Densité		Viscosité dynamique maximale possible	Normes existantes
	solide	liquide		
1.4.1.1. Aréomètre		oui	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2. Balance hydrostatique	oui			
a) solides				ISO 1183 (A)
b) liquides		oui	5 Pa s	ISO 901 et 758
1.4.1.3. Méthode du corps immergé		oui	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pycnomètre	oui			
a) solides				ISO 3507 ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) liquides		oui	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Pycnomètre de comparaison à air	oui			DIN 55990 partie 3, DIN 53243
1.4.4. Densimètre oscillant		oui	5 Pa s	

4. **REFERENCES**

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 109, Décision du Conseil C(81) 30 Final.
- (2) R. Weissberger ed., *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed, Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. 1, Part 1.
- (3) IUPAC, *Recommended reference materials for realisation of physico-chemical properties*, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- (4) Wagenbreth, H., *Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten*, Technisches Messen tm, 1979, vol. 11, 427-430.

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

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

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

Annexe

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

1. METHODES DE FLOTTABILITE

1.1. Aréomètre

DIN 12790, ISO 387 Hydrometer; general instructions

DIN 12791 Part I : Density hydrometers; construction, adjustment and use

Part II : Density hydrometers; standardized sizes, designation

Part III : Use and test

ISO 649-2 Laboratory glassware : Density hydrometers for general purpose

NF T 20-050 Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la densité des liquides — Méthode aréométrique

DIN 12793 Laboratory glassware : range find hydrometers

1.2. Balance hydrostatique

Pour les substances solides

ISO 1183 Method A : Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-049 Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la densité des solides autres que les poudres et les produits alvéolaires — Méthode de la balance hydrostatique

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 901 ISO 758

DIN 51757 Testing of mineral oil 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. Méthode du corps immergé

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

2. METHODES PYCNOMETRIQUES

2.1. Pour les substances liquides

ISO 3507 Pycnometers

ISO 758 Liquid chemical products; determination of density at 20 °C

DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)

DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100,10^{-6} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 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 $100,10^{-6} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ 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

NF T 20-053 Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la densité des solides en poudre et des liquides — Méthode pycnométrique

2.2. Pour les substances solides

ISO 1183 Method B : Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-053 Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la densité des solides en poudre et des liquides — Méthode pycnométrique

DIN 19683 Determination of the density of soils

3. PYCNOMETRE 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. METHODES

La plupart des méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Les principes fondamentaux sont énoncés dans les références (2) et (3).

1.1. INTRODUCTION

Il est souhaitable de disposer d'informations préliminaires concernant la structure, la température de fusion et la température 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 des pressions de vapeur. C'est pourquoi plusieurs méthodes sont recommandées pour la mesure des pressions de vapeur allant de $< 10^{-4}$ Pa à 10^5 Pa.

D'une manière générale, les impuretés ont sur la pression de vapeur une incidence dont l'importance dépend en grande partie de la nature de l'impureté.

Si l'échantillon contient des impuretés volatiles qui peuvent avoir une influence sur le résultat, il convient de purifier la substance. Il peut également être nécessaire d'indiquer la pression de vapeur pour le produit technique.

Certaines méthodes décrites ici utilisent des appareils contenant des parties métalliques; ceci doit être pris en considération pour les essais concernant des substances corrosives.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La pression de vapeur d'une substance est la pression de saturation au-dessus d'une substance solide ou liquide. A 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 (Pa).

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

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

1 atmosphère = $1,013 \times 10^5$ Pa

1 bar = 10^5 Pa

L'unité SI de température est le kelvin (K).

La constante molaire des gaz parfaits R est égale à $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

La dépendance de la pression de vapeur vis-à-vis de la température est décrite par l'équation de Clausius-Clapeyron:

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

où:

p = pression de vapeur de la substance, exprimée en pascal

ΔH_v = chaleur de vaporisation, exprimée en J mol^{-1}

R = constante molaire des gaz parfaits en $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = température thermodynamique, exprimée en kelvin.

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre la comparaison avec les résultats obtenus avec d'autres méthodes.

1.4. PRINCIPE DES METHODES

Le présent paragraphe propose sept méthodes de détermination de la pression de vapeur qui sont applicables à différentes gammes de pression de vapeur. Dans le cadre de chaque méthode, la pression de vapeur est déterminée à différentes températures. Dans une gamme de températures limitée, 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 à 10^5 Pa.

Cette méthode a aussi été recommandée pour la mesure de la température d'ébullition normale lorsque celle-ci ne dépasse pas 600 K.

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 à 10^5 Pa. Cette méthode peut aussi être utilisée dans une gamme allant de 1 à 10 Pa à condition de prendre des précautions.

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. La norme ASTM D-2879-86 contient des informations supplémentaires.

Gamme recommandée :
de 100 à 10^5 Pa.

1.4.4. Méthode d'effusion : balance de pression de vapeur

La quantité de substance quittant une cellule par unité de temps, par une ouverture de taille connue, est déterminée dans des conditions de vide telles que le retour de la substance dans la cellule soit négligeable (par exemple par mesure de l'impulsion imprimée à une balance sensible par un jet de vapeur ou encore par la mesure de la perte de poids de la cellule).

Gamme recommandée :
 10^{-3} à 1 Pa.

1.4.5. Méthode d'effusion : par perte de poids ou par collecte du vaporisat

Cette méthode repose sur l'estimation de la masse de la substance à tester qui s'écoule, par unité de temps, d'une cellule de Knudsen (4) sous forme de vapeur, au travers d'un capillaire et dans des conditions de vide poussé. La masse de la vapeur formée peut être mesurée, soit en déterminant la perte de masse de la cellule, soit par condensation de la vapeur à basse température; la quantité de substance volatilisée peut alors être déterminée à l'aide d'une analyse chromatographique. La pression de vapeur est calculée en appliquant l'équation d'Hertz-Knudsen.

Gamme recommandée :
de 10^{-3} à 1 Pa.

1.4.6. Méthode de saturation des gaz

Un courant de gaz porteur inerte est envoyé à travers la substance de telle façon qu'il en ressorte saturé de vapeur. La quantité de matière transportée par un volume connu de gaz porteur peut être mesurée après avoir été recueillie dans un collecteur approprié ou estimée à l'aide d'une technique analytique directe. Le résultat obtenu permet de calculer la pression de vapeur à une température donnée.

Gamme recommandée :
de 10^{-4} à 1 Pa. Cette méthode est aussi applicable à une gamme de 1 à 10 Pa à condition de prendre des précautions.

1.4.7. Méthode du rotor

Dans la jauge à rotor, l'élément de mesure réel est une petite bille d'acier en suspension dans un champ magnétique qui est soumise à une rotation à grande vitesse. La pression du gaz est déduite du ralentissement de la bille d'acier dû à la pression.

Gamme recommandée :
de 10^{-4} à $0,5$ Pa.

1.5. CRITERES DE QUALITE

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 reproductibilité ⁽¹⁾	Gamme recommandée	Norme existante
	solide	liquide				
1.4.1. Méthode dynamique	fusion basse	x	jusqu'à 25%	jusqu'à 25%	de 10 ³ Pa à 2 × 10 ³ Pa	—
			de 1 à 5%	de 1 à 5%	de 2 × 10 ³ Pa à 10 ⁵ Pa	—
1.4.2. Méthode statique	x	x	de 5 à 10%	de 5 à 10%	de 10 Pa à 10 ⁵ Pa ⁽²⁾	NFT 20 048 (5)
1.4.3. Isoténiscope	x	x	de 5 à 10%	de 5 à 10%	de 10 ² Pa à 10 ⁵ Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Méthode d'effusion, balance de pression	x	x	de 5 à 20%	jusqu'à 50%	de 10 ⁻³ Pa à 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Méthode d'effusion, perte de poids	x	x	de 10 à 30%	—	de 10 ⁻³ Pa à 1 Pa	—
1.4.6. Méthode de saturation des gaz	x	x	10 à 30%	jusqu'à 50%	de 10 ⁻⁴ Pa à 1 Pa ⁽²⁾	—
1.4.7. Méthode par rotation	x	x	de 10 à 20%	—	de 10 ⁻⁴ Pa à 0,5 Pa	—

⁽¹⁾ Dépendant du degré de pureté.

⁽²⁾ Ces méthodes peuvent aussi être utilisées dans une gamme de 1 à 10 Pa à condition de prendre des précautions.

1.6. DESCRIPTION DES METHODES

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 (figure 1), un dispositif de mesure de la température et un système de régulation et de mesure de la pression. L'appareil de mesure type représenté sur le schéma est en verre et se compose de cinq parties :

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

Un cylindre de verre relié à une pompe Cottrel, 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.

La température est mesurée à l'aide d'un détecteur approprié (par exemple un thermomètre à résistance ou un thermocouple à enveloppe) immergé dans l'appareil au point de mesure (n° 5, figure 1) par un orifice d'admission approprié (par exemple un joint mâle rodé).

Cet appareil est relié à un dispositif de régulation et de mesure de la pression.

L'ampoule, qui sert de volume tampon, est reliée à l'appareil de mesure par l'intermédiaire d'un tube capillaire.

L'appareil à reflux est chauffé à l'aide d'un élément chauffant (par exemple une cartouche chauffante) inséré dans le bas de l'appareil en verre. Le courant nécessaire pour le chauffage est établi et contrôlé au moyen d'un thermocouple.

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

Une soupape appropriée est utilisée pour contrôler l'arrivée d'air ou d'azote afin d'établir la pression souhaitée (entre 10² et 10⁵ Pa environ) et d'assurer la ventilation.

La pression est mesurée à l'aide d'un manomètre.

1.6.1.2. Mesure

On mesure la pression de vapeur en déterminant la température d'ébullition de l'échantillon à plusieurs pressions spécifiées comprises entre 10³ et 10⁵ Pa environ. La température d'ébullition est atteinte lorsque la température reste constante à une pression donnée. Cette méthode n'est pas applicable aux substances moussantes.

La substance est placée dans une colonne propre et sèche. Quand les solides ne sont pas sous forme de poudre, le remplissage peut poser des problèmes. Toutefois, il est parfois possible d'y remédier en chauffant la gaine de refroidissement. Après remplissage, l'appareil est scellé au collet et la substance est dégazée. La plus basse des pressions désirées est alors établie et le système de chauffage est mis en marche en même temps que le détecteur de température est connecté à un enregistreur.

L'équilibre est atteint lorsque la température d'ébullition enregistrée est constante pour une pression donnée. Il faut prendre particulièrement soin d'éviter les soubresauts pendant l'ébullition. En outre, il peut se produire une condensation complète sur le réfrigérant. Lors de la détermination de la pression de vapeur de solides dont la température de fusion est basse, il convient de prendre soin d'éviter le bouchage du condenseur.

Après enregistrement de ce point d'équilibre, une pression plus élevée est établie. Le processus se poursuit de la même manière jusqu'à ce qu'une pression de 10⁵ 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 comporte un récipient où placer l'échantillon ainsi qu'un système de chauffage et de refroidissement permettant de contrôler et de mesurer la température de l'échantillon. Il comporte également un dispositif de réglage et de mesure de la pression. Les figures 2a et 2b illustrent les principes fondamentaux de cette méthode.

La cellule où est placé l'échantillon (figure 2a) est reliée d'un côté à un robinet à vide poussé et, de l'autre, 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 branches mènent à la pompe à vide, à un récipient à azote ou à la soupape de ventilation et à un manomètre.

Le tube en U peut être remplacé par une jauge de pression munie d'un indicateur de pression (figure 2b).

Pour amener l'échantillon à la température choisie, le récipient contenant l'échantillon ainsi que le robinet et le tube en U ou la jauge de pression, sont plongés dans un bain maintenu à une température constante de $\pm 0,2$ K. La température est mesurée au niveau de la paroi extérieure du récipient contenant l'échantillon, ou à l'intérieur de celui-ci.

Une pompe à vide munie d'un piège réfrigérant en amont est utilisée pour faire le vide dans l'appareil.

Dans la méthode 2a, la pression de vapeur de la substance est mesurée indirectement à l'aide d'un indicateur de zéro. Cette méthode tient compte du fait que la densité du fluide dans le tube en U est modifiée par un changement important de la température.

Différents liquides, huiles de silicone et phtalates, peuvent être utilisés comme indicateur de zéro dans le tube en U, selon la gamme de pressions et le comportement chimique de la substance. La substance à tester ne doit pas se dissoudre ou réagir d'une manière notable avec le liquide du tube en U.

Pour le manomètre, le mercure peut être utilisé pour une gamme de pression d'air normale jusqu'à 10^2 Pa, alors que les huiles de silicone et les phtalates conviennent en dessous de 10^2 Pa et jusqu'à 10 Pa. Quant aux manomètres à membrane chauffables, ils peuvent même être utilisés pour des pressions inférieures à 10^{-1} Pa. Il existe d'autres jauges de pression qui peuvent aussi être utilisées en dessous de 10^2 Pa.

1.6.2.2. *Mesure*

Avant la mesure, toutes les parties de l'appareil schématisé sur la figure 2 sont soigneusement nettoyées et séchées.

Pour la méthode 2a, le tube en U est rempli avec le liquide choisi, qui doit être dégazé à une température élevée avant d'effectuer les lectures.

La substance à tester est placée dans l'appareil, qui est alors fermé et la température est suffisamment abaissée pour permettre le dégazage. La température doit être assez basse pour que l'air soit aspiré, mais sans toutefois modifier la composition du produit dans le cas de systèmes constitués de plusieurs composants. L'équilibre peut, si nécessaire, être établi plus rapidement par agitation.

L'échantillon peut être refroidi plus efficacement, par exemple à l'aide d'azote liquide (attention à la condensation de l'air et du liquide de la pompe) ou d'un mélange d'éthanol et de glace carbonique. Pour les mesures à basse température, il convient d'utiliser un bain thermostaté relié à un cryostat.

Pour faire le vide dans l'appareil, l'air est aspiré pendant plusieurs minutes, le robinet qui se trouve au dessus du récipient contenant l'échantillon étant ouvert. Le robinet est ensuite fermé et l'échantillon est amené à la plus basse des températures voulues. L'opération de dégazage doit, si nécessaire, être répétée plusieurs fois.

Lorsque l'échantillon est chauffé, la pression de vapeur augmente, ce qui modifie l'équilibre du liquide dans le tube en U. Pour compenser ce changement, on fait entrer de l'azote ou de l'air dans l'appareil en ouvrant le robinet jusqu'à ce que le liquide indicateur de pression soit revenu au zéro. La pression nécessaire peut être lue sur un manomètre de précision à température ambiante. Cette pression correspond à la pression de vapeur de la substance à une température donnée.

La méthode 2b est similaire mais la pression de vapeur est lue directement.

La dépendance de la pression de vapeur vis-à-vis de la température est déterminée à des intervalles appropriés (environ 5 à 10 mesures en tout à intervalles courts) jusqu'au maximum désiré. Les mesures à basse température doivent être répétées pour vérification.

Si les valeurs obtenues en effectuant des mesures répétées ne coïncident pas avec la courbe obtenue pour des températures croissantes, cela peut être dû à l'une des raisons suivantes :

1. L'échantillon contient encore de l'air (par exemple dans le cas de produits d'une viscosité élevée) ou des substances dont la température d'ébullition est basse, qui ont été libérées pendant le chauffage et peuvent être éliminés par aspiration après une étape de sur-réfrigération supplémentaire.

2. La température de refroidissement n'est pas assez basse. Il faut alors utiliser de l'azote liquide comme réfrigérant.

S'il s'avère que le problème est dû à l'une de ces deux raisons, il convient de répéter les mesures.

3. La substance subit une réaction chimique dans la gamme de température utilisée (par exemple : décomposition, polymérisation).

1.6.3. **Isoténiscope**

Pour une description complète de cette méthode, se référer à la référence 7. Le principe de l'appareil de mesure est décrit dans la figure 3. A l'instar de la méthode statique décrite au point 1.6.2, la méthode à 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. Une quantité de liquide suffisante pour remplir l'ampoule et la partie courte du manomètre est versée dans l'isoténiscope. L'isoténiscope est ensuite relié à une pompe à vide; une fois le vide fait dans l'appareil, celui-ci est rempli d'azote. L'évacuation et la purge de système sont répétées deux fois afin d'éliminer l'oxygène résiduel. L'isoténiscope rempli est placé en position horizontale de telle sorte que l'échantillon forme une couche fine dans l'ampoule et dans le manomètre (partie en U). La pression du système est réduite à 133 Pa et l'échantillon est chauffé doucement jusqu'au début de l'ébullition afin d'éliminer les gaz dissous fixés. L'isoténiscope est ensuite placé de telle manière que l'échantillon revienne remplir entièrement l'ampoule et la branche courte du manomètre. La pression est maintenue comme pour le dégazage; la pointe de l'ampoule est chauffée à l'aide d'une petite flamme jusqu'à ce que la vapeur provenant de l'échantillon soit suffisante pour déplacer une partie de l'échantillon de la partie supérieure de l'ampoule et de la branche du manomètre vers la partie manomètre de l'isoténiscope, créant ainsi un espace dépourvu d'azote et rempli de vapeur.

L'isoténiscope est ensuite placé dans un bain thermostaté, et la pression d'azote est réglée de manière à être la même que celle de l'échantillon. La balance de pressions est indiquée par la partie manomètre de l'isoténiscope. A l'équilibre, la pression de vapeur de l'azote est égale à celle de la substance.

Dans le cas des solides, le manomètre est rempli avec l'un des liquides énumérés au point 1.6.2.1, choisi en fonction de la gamme de pression et de température. L'ampoule du côté de la partie la plus longue de l'isoténiscope est remplie avec le liquide dégazé du manomètre. Le solide à examiner est ensuite introduit dans l'ampoule et dégazé à haute

température. L'isoténoscope est alors incliné de telle sorte que le liquide du manomètre puisse couler dans le tube en U. La pression de vapeur est mesurée en fonction de la température conformément à la description présentée au point 1.6.2.

1.6.4. Méthode d'effusion : balance de pression de vapeur

1.6.4.1. Appareil

Plusieurs modèles d'appareil sont décrits dans la littérature (1). L'appareil représenté à la figure 4 illustre le principe général de la méthode. Il se compose principalement d'une cuve à vide poussé en acier inoxydable ou en verre, d'une pompe avec dispositif de mesure du vide et d'un équipement incorporé permettant de mesurer la pression de vapeur sur une balance. Les équipements suivants sont incorporés à l'appareil :

— Un four d'évaporation avec bride et canal d'alimentation rotatif. Il s'agit d'un récipient cylindrique, fabriqué par exemple en cuivre ou en un alliage chimiquement résistant d'une bonne conductivité thermique. Un récipient de verre doublé d'une paroi de cuivre peut également être utilisé. Le four a un diamètre de 3 à 5 cm et une hauteur de 2 à 5 cm, environ; il possède de un à trois orifices d'évaporation de sections différentes. Le chauffage du four est produit, soit par une plaque chauffante située en-dessous, soit par une spirale chauffante qui l'entoure à l'extérieur. Afin d'éviter une dissipation de la chaleur vers le plateau de base, le système de chauffage est fixé sur ce dernier à l'aide d'un métal de faible conductivité thermique (acier au nickel-argent ou au chrome-nickel); par exemple, si le four utilisé est muni de plusieurs orifices, un tuyau d'acier au nickel-argent est attaché à un canal d'alimentation rotatif. Ce dispositif présente l'avantage de permettre l'introduction d'une barre de cuivre ce qui permet d'assurer le refroidissement par l'extérieur à l'aide d'un bain réfrigérant.

— Le couvercle du four en cuivre possédant trois orifices de sections différentes, situés à 90 degrés l'un de l'autre, permet de couvrir plusieurs gammes de pression de vapeur au sein de la gamme de mesures globales (orifices d'un diamètre de 0,30 à 4,50 mm environ). Des ouvertures larges sont utilisées pour les pressions de vapeur basses et *vice versa*. L'orifice choisi ou une position intermédiaire dans le flux de vapeur (orifice du four — bouclier — plateau de la balance) est sélectionné par rotation du four, ce qui permet de diriger le flux moléculaire sur le plateau de la balance au travers de l'orifice du four, ou de l'en dévier. La température de la substance est mesurée à l'aide d'un thermocouple ou d'un thermomètre à résistance placé à un endroit approprié.

— Le plateau d'une microbalance ultrasensible est placé sous le bouclier (voir ci-après). Le plateau de la balance a un diamètre de 30 mm environ. L'aluminium, revêtu d'une couche d'or est un matériau approprié.

— Le plateau de la balance est entouré par un cylindre en laiton ou une enceinte de réfrigération en cuivre. Certains types de balances disposant d'un orifice pour le fléau de la balance et d'un orifice dans le bouclier permettant le passage du flux moléculaire assurent une condensation complète de la vapeur sur le plateau de la balance. La dissipation de la chaleur vers l'extérieur est assurée par une barre de cuivre connectée à l'enceinte de réfrigération. Cette barre thermiquement isolée au moyen d'un tube d'acier au chrome-nickel, par exemple, traverse le plateau de base. Sous le plateau de base, la barre plonge dans un vase de Dewar contenant de l'azote liquide, ou de l'azote liquide circule au travers de cette barre. L'enceinte de réfrigération est ainsi maintenue à une température d'environ - 120 °C. Le plateau de la balance n'est refroidi que par rayonnement ce qui suffit pour la gamme de pressions soumises à l'étude (refroidir une heure environ avant le début des mesures).

— La balance est placée au-dessus de l'enceinte de réfrigération. On peut citer parmi les balances qui conviennent pour cette méthode la microbalance électronique ultrasensible à deux bras (8) ou la balance ultrasensible à bobine mobile (voir la ligne directrice 104 de l'OCDE, édition 12 mai 1981).

— Le plateau de base comporte aussi des connexions électriques pour thermocouples (ou pour thermomètres à résistance) et bobines de chauffage.

— Le vide est produit dans le récipient à l'aide d'une pompe à vide partiel ou d'une pompe à vide poussé (le vide requis, correspondant à une pression d'environ $1 \text{ à } 2 \times 10^{-3} \text{ Pa}$, est obtenu après deux heures de pompage). La pression est contrôlée à l'aide d'un manomètre à ionisation approprié.

1.6.4.2. Mesure

Le récipient est rempli avec la substance à tester et le couvercle est fermé. Le bouclier et l'enceinte de réfrigération sont glissés de l'autre côté du four. L'appareil est fermé et les pompes à vide sont branchées. La pression à obtenir avant le commencement de la mesure est d'environ 10^{-4} Pa . Le refroidissement de l'enceinte de réfrigération commence à 10^{-2} Pa .

Une série d'étalonnage à la plus basse des températures choisies commence dès que le vide nécessaire est atteint. L'orifice approprié dans le couvercle est ouvert et le jet de vapeur qui traverse le bouclier juste au-dessus de l'orifice vient frapper le plateau réfrigéré de la balance. Ce dernier doit être d'une taille suffisante pour garantir que le jet qui traverse le bouclier l'atteint tout entier. L'impulsion du jet de vapeur, exerce une force sur le plateau de la balance et les molécules se condensent au contact de sa surface froide.

Cette impulsion et la condensation simultanée produisent un signal sur l'enregistreur. L'évaluation des signaux fournit deux types d'informations :

1. L'appareil décrit ici permet de déterminer la pression de vapeur directement à partir de la force exercée sur le plateau de la balance [il n'est pas nécessaire pour cela de connaître le poids moléculaire (2)]. Des facteurs géométriques, tels que la section de l'orifice du four et l'angle du flux moléculaire, doivent être pris en considération pour l'évaluation des lectures.

2. La masse du condensat peut être mesurée en même temps et on peut en déduire la vitesse d'évaporation. La pression de vapeur peut également être calculée à partir de la vitesse d'évaporation et du poids moléculaire à l'aide de l'équation de Hertz (2).

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

où :

G = vitesse d'évaporation ($\text{kg s}^{-1} \text{ m}^{-2}$)

M = masse molaire (g mol^{-1})

T = température (K)

R = constante molaire des gaz parfaits ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

p = pression de vapeur (Pa)

Lorsque le vide nécessaire est atteint, une série de mesures est entreprise à la plus basse des températures choisies.

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. Si les résultats du second enregistrement ne confirment pas ceux du premier, il est possible que la substance se décompose aux températures choisies pour la détermination.

1.6.5. Méthode d'effusion—par perte de poids

1.6.5.1. Appareil

L'appareil utilisé dans la présente méthode comporte principalement les éléments suivants :

— une cuve dont la température et la pression peuvent être contrôlées, dans laquelle sont placées les cellules à effusion;

— une pompe à vide poussé (par exemple une pompe à diffusion ou une pompe turbomoléculaire) accompagnée d'une jauge à vide;

— un piège contenant de l'azote liquide ou de la glace carbonique.

La figure 5 présente un exemple de cuve à vide en aluminium, munie d'un système de chauffage électrique, contenant quatre cellules à effusion en acier inoxydable. La feuille d'acier inoxydable, d'une épaisseur de 0,3 mm, et percée d'un orifice à effusion d'un diamètre de 0,2 à 1,0 mm est fixée à la cellule à effusion à l'aide d'un couvercle fileté.

1.6.5.2. Mesure

La substance de référence et la substance à tester sont versées dans la cellule à effusion. Le diaphragme métallique percé d'un orifice est fixé à l'aide du couvercle fileté et la cellule est pesée avec une précision de 0,1 mg. La cellule est placée dans l'appareil thermostaté où la pression est alors réglée à une valeur correspondant au dixième de la pression attendue. On laisse entrer de l'air dans l'appareil à des intervalles de temps définis entre 5 et 30 heures, et la perte de masse de la cellule à effusion est déterminée grâce à une nouvelle pesée.

Pour s'assurer que les résultats ne sont pas perturbés par la présence d'impuretés volatiles, la cellule est pesée à intervalles réguliers, ce qui permet de vérifier que le taux d'évaporation est constant, au moins pendant deux intervalles de temps.

La pression de vapeur p dans la cellule d'effusion est calculée au moyen de l'équation suivante :

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

où :

p = pression de vapeur (Pa)

m = masse de la substance qui quitte la cellule pendant le temps t (kg)

t = temps (s)

A = surface de l'orifice (m^2)

K = facteur de correction

R = constante molaire des gaz parfaits ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

T = température (K)

M = masse moléculaire (kg mol^{-1})

1.6.6. Méthode de saturation des gaz

1.6.6.1. Appareil

Le facteur de correction K dépend du rapport de la longueur sur le rayon de l'orifice cylindrique:

rapport:	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K:	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

On peut écrire l'équation suivante:

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

où $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2\pi R}$ représente la constante de la cellule à effusion.

Cette constante E peut être déterminée à l'aide de substances de référence (2,9), en appliquant l'équation suivante:

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

où:

p(r) = pression de vapeur de la substance de référence (Pa)

M(r) = masse moléculaire de la substance de référence (kg mol^{-1})

1.6.6. Méthode de saturation des gaz.

1.6.6.1. Appareil. L'appareil utilisé dans la présente méthode comporte un certain nombre d'éléments qui sont schématisés sur la figure 6 a et décrits ci-après (1).

Gaz inerte :

Le gaz porteur ne doit pas réagir avec la substance à tester. L'azote convient dans la plupart des cas mais d'autres gaz peuvent parfois être employés (10). Le gaz choisi doit être sec (voir figure 6 a, 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 adsorbants solides.

Au lieu de recueillir la vapeur pour l'analyser ultérieurement, il est possible d'utiliser des techniques analytiques directes, comme la chromatographie, pour déterminer la quantité de matériel transporté par un volume connu de gaz porteur. De surcroît, la perte de masse de l'échantillon peut être mesurée.

Enceinte calorifugée :

Pour les mesures à différentes températures, il peut être nécessaire de prévoir une enceinte calorifugée.

Colonne de saturation :

La substance à tester en solution est déposée sur un support inerte qui est ensuite tassé 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. La colonne doit être thermostatée. Pour les déterminations s'effectuant à des températures supérieures à la température ambiante, l'espace entre la colonne et les collecteurs doit être chauffé pour empêcher la condensation de la substance.

Afin de diminuer la diffusion de la matière, un tube capillaire peut être placé après la colonne de saturation (figure 6 b).

1.6.6.2. Mesure

Préparation de la colonne de saturation :

Après mise en solution dans un solvant très volatil, une partie de la substance d'essai est ajoutée à une quantité donnée du matériau de support. La quantité de substance ajoutée à une quantité adaptée du support 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 thermostaté, un courant d'azote sec est envoyé à travers l'appareil.

Mesure :

Les collecteurs ou le détecteur direct sont reliés aux tubes de sortie de la colonne et le temps est enregistré. 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 à pression entre le saturateur et les pièges (cette méthode peut se révéler peu satisfaisante en raison de l'accroissement du volume mort et de la surface d'adsorption) ou

b) en déterminant la perte de charge du système de pièges utilisé, en fonction du débit dans une expérience séparée (cette méthode peut se révéler peu satisfaisante pour les collecteurs 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. Au lieu de recueillir la substance pour l'analyser ultérieurement, il est possible d'avoir recours à des techniques analytiques quantitatives directes (comme la chromatographie). 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.

1.6.6.3. 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 :

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

où :

p = pression de vapeur (Pa)

W = masse de la substance évaporée (kg)

V = volume de gaz saturé (m³)

R = constante molaire des gaz parfaits (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = température (K)

M = masse molaire de la substance à tester (kg mol⁻¹)

Les volumes mesurés doivent être corrigés pour tenir compte des différences de pression et de température entre le débitmètre et le saturateur thermostaté. 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).

1.6.7. Méthode du rotor (8,11, 13)**1.6.7.1. Appareil**

La présente méthode peut être réalisée à l'aide d'une jauge à viscosité à rotor représentée à la figure 8. Le montage expérimental est schématisé à la figure 7.

L'appareil de mesure type comporte une tête de mesure à rotor placée dans une enceinte thermostatée (réglée avec une précision de 0,1 °C). Le récipient qui contient l'échantillon est placé dans une enceinte thermostatée (réglée avec une précision de 0,01 °C); tous les autres éléments du montage sont maintenus à une température supérieure afin d'éviter la condensation. Un dispositif de pompe à vide poussé est connecté au système au moyen de vannes appropriées.

La tête de mesure à rotor est constituée d'une bille d'acier (d'un diamètre de 4 à 5 mm) placée dans un tube. La bille est mise en suspension et stabilisée dans un champ magnétique généralement au moyen d'aimants permanents et de bobines de contrôle.

La bille est mise en mouvement par les champs rotatifs produits par les bobines. La vitesse de rotation de la bille est mesurée grâce aux bobines de lecture qui déterminent sa faible, mais toujours présente, magnétisation latérale.

1.6.7.2. Mesure

Lorsque la bille a atteint une vitesse de rotation donnée $v(0)$, (généralement de 400 révolutions par seconde environ), on coupe l'alimentation et la décélération, due à la friction par le gaz, commence.

La chute de la vitesse de rotation est mesurée en fonction du temps. La friction due à la suspension magnétique

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{\sigma 10 t} \times \ln \frac{v(t)}{v(0)}$$

où:

\bar{c} = vitesse moyenne des molécules de gaz

r = rayon de la bille

ρ = densité massique de la bille

σ = coefficient de transfert tangentiel du moment ($\sigma = 1$ si la bille a une surface sphérique idéale)

t = temps

$v(t)$ = vitesse de rotation après un temps t

$v(0)$ = vitesse de rotation initiale

Cette équation peut également s'écrire de la manière suivante:

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

où t_n , et t_{n-1} , sont les temps requis pour effectuer un nombre donné N de révolutions. Ces intervalles de temps t_n et t_{n-1} se succèdent et $t_n > t_{n-1}$.

La vitesse moyenne de la molécule de gaz \bar{c} est donnée par l'équation suivante:

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

où:

T = température

R = constante molaire des gaz parfaits

M = masse molaire

étant négligeable par rapport à la friction du gaz, la pression du gaz est donnée par l'équation suivante :

2. DONNEES

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. RESULTATS

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

- la méthode utilisée;
 - les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, s'il y a lieu, l'étape de purification préliminaire;
 - au moins deux valeurs pour la pression de vapeur et la température, de préférence comprise entre 0 et 50 °C;
 - toutes les données brutes;
 - une courbe de $\log p$ en fonction de $1/T$;
 - une estimation de la pression de vapeur à 20 °C ou 25 °C.
- En cas de modification (changement d'état, décomposition) :
- nature de la modification;

— température à laquelle la modification survient à la pression atmosphérique;

— pression de vapeur à 10 °C et 20 °C en dessous et au-dessus de la température de transition (sauf en cas de passage de l'état solide à l'état gazeux).

Toutes les informations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, en particulier les impuretés et l'état physique de la substance.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 104, décision du Conseil C(81) 30 Final.
- (2) Ambrose, D. in B. Le Neindre; B. Vodar, (Eds.) : Experimental Thermodynamics, Butterworths, London, 1975, Vol. II.
- (3) R. Weissberger ed. : Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Chapter IX, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. I, Part 1.
- (4) Knudsen, M. Ann Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, 593.
- (5) NF T 20-047 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-1} à 10^5 Pa. Méthode statique.
- (6) NF T 20-048 AFNOR (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la pression de vapeur des solides et des liquides dans le domaine 10^{-3} à 1 Pa. Méthode de la balance de pression de vapeur.
- (7) ASTM D 2879-86 Standard test method for vapour pressure-temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isotenscope.
- (8) G. Messer, P. Röhl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac Sci. Technol.(A), 1987, vol. 5 (4), 2440.
- (9) Ambrose, D.; Lawrenson, I.J.; Sprake, C.H.S. J. Chem Thermodynamics 1975, vol. 7, 1173.
- (10) B.F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.
- (11) G. Comsa, J.K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, vol. 17 (2), 642.
- (12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, vol. 20 (4), 1148.
- (13) J.K. Fremerey. J. Vac Sci. Technol.(A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

Annexe 1

Méthode d'estimation

INTRODUCTION

Des valeurs calculées de la pression de vapeur peuvent être utilisées pour :

- choisir la méthode expérimentale;
- fournir une estimation ou une valeur limite au cas où la méthode expérimentale ne peut pas être appliquée pour des raisons techniques (notamment lorsque la pression de vapeur est très faible);
- contribuer à déceler les cas où il est justifié de ne pas effectuer de mesures expérimentales car la pression de vapeur serait $< 10^{-5}$ Pa à la température ambiante.

METHODE D'ESTIMATION

La pression de vapeur des liquides et des solides peut être estimée à l'aide de la corrélation de Watson modifiée (a). La seule donnée expérimentale requise est le point d'ébullition normal. Cette méthode est applicable à des pressions comprises entre 10^5 et 10^{-5} Pa.

Cette méthode est décrite en détail dans « Handbook of Chemical Property Estimation Methods » (b).

CALCUL

D'après la méthode décrite dans la référence (b), la pression de vapeur est calculée de la manière suivante:

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

où:

T = température choisie

T_b = point d'ébullition normal

P_{vp} = pression de vapeur à la température T

ΔH_{vb} = température de vaporisation

ΔZ_b = facteur de compressibilité (estimé à 0,97)

m = facteur empirique dépendant de l'état physique à la température choisie.

De plus:

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

où K_F est un facteur empirique qui tient compte de la polarité de la substance. Les facteurs K_F pour plusieurs types de composés sont énumérés à la référence (b).

Il est fréquent que l'on dispose de données mentionnant un point d'ébullition à une pression réduite. Dans ce cas, la pression de vapeur est calculée comme suit [conformément à (b)]:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[1 - (3 - 2 \frac{T}{T_1})^m \frac{T_1}{T} - 2 m (3 - 2 \frac{T}{T_1})^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right]$$

où T₁ est le point d'ébullition à la pression réduite P₁.

PROCES-VERBAL

Lorsque la méthode d'estimation est utilisée, le procès-verbal doit comporter une documentation détaillée concernant le calcul.

REFERENCES

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

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

Annexe 2

Figure 1

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

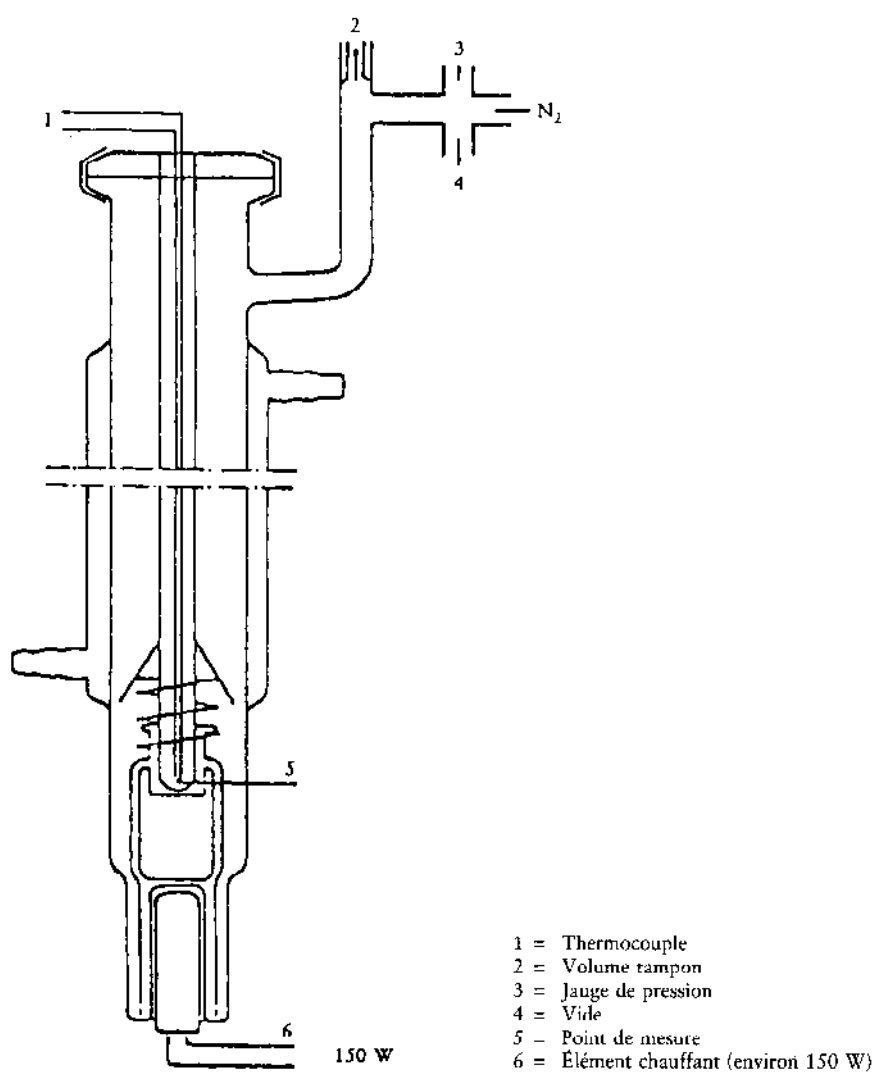
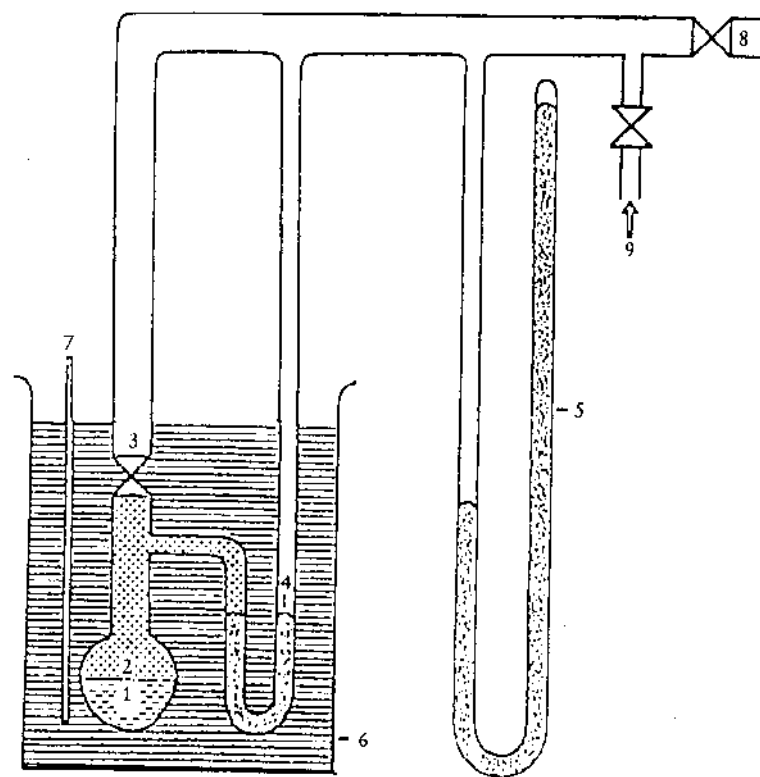


Figure 2a

Appareil de détermination de la courbe de pression de vapeur, selon la méthode statique (en utilisant un manomètre à tube en U)

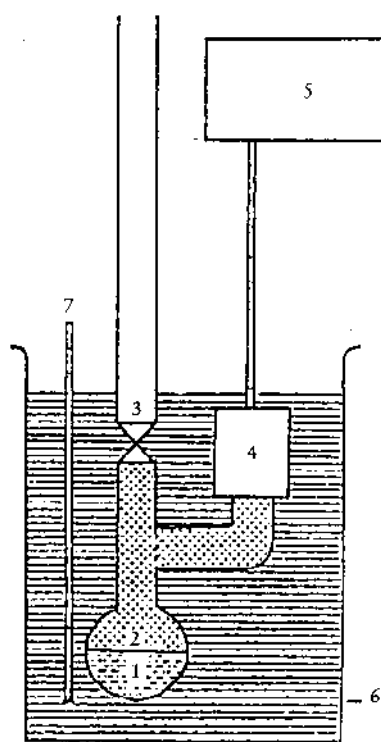


- 1 - Substance à tester
- 2 = Vapeur
- 3 = Robinet à vide poussé
- 4 = Tube en U (manomètre)
- 5 = Manomètre (auxiliaire)

- 6 = Bain thermostaté
- 7 = Dispositif de mesure de la température
- 8 = Vers la pompe à vide
- 9 = Ventilation

Figure 2b

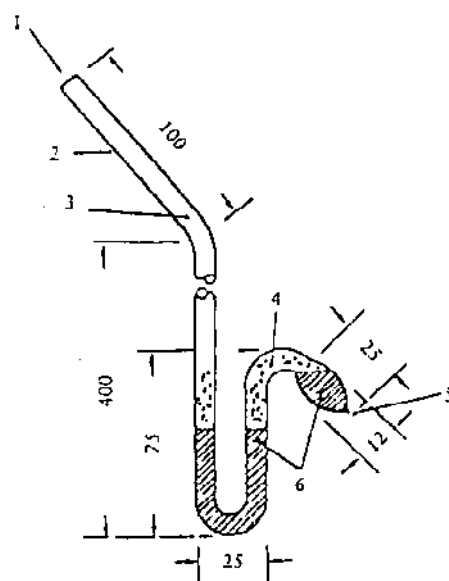
Appareil de détermination de la courbe de pression de vapeur, suivant la méthode statique (en utilisant un indicateur de pression)



1 = Substance à tester
2 = Vapeur
3 = Robinet à vide poussé
4 = Jauge de pression

5 = Indicateur de pression
6 = Bain thermostaté
7 = Dispositif de mesure de la température

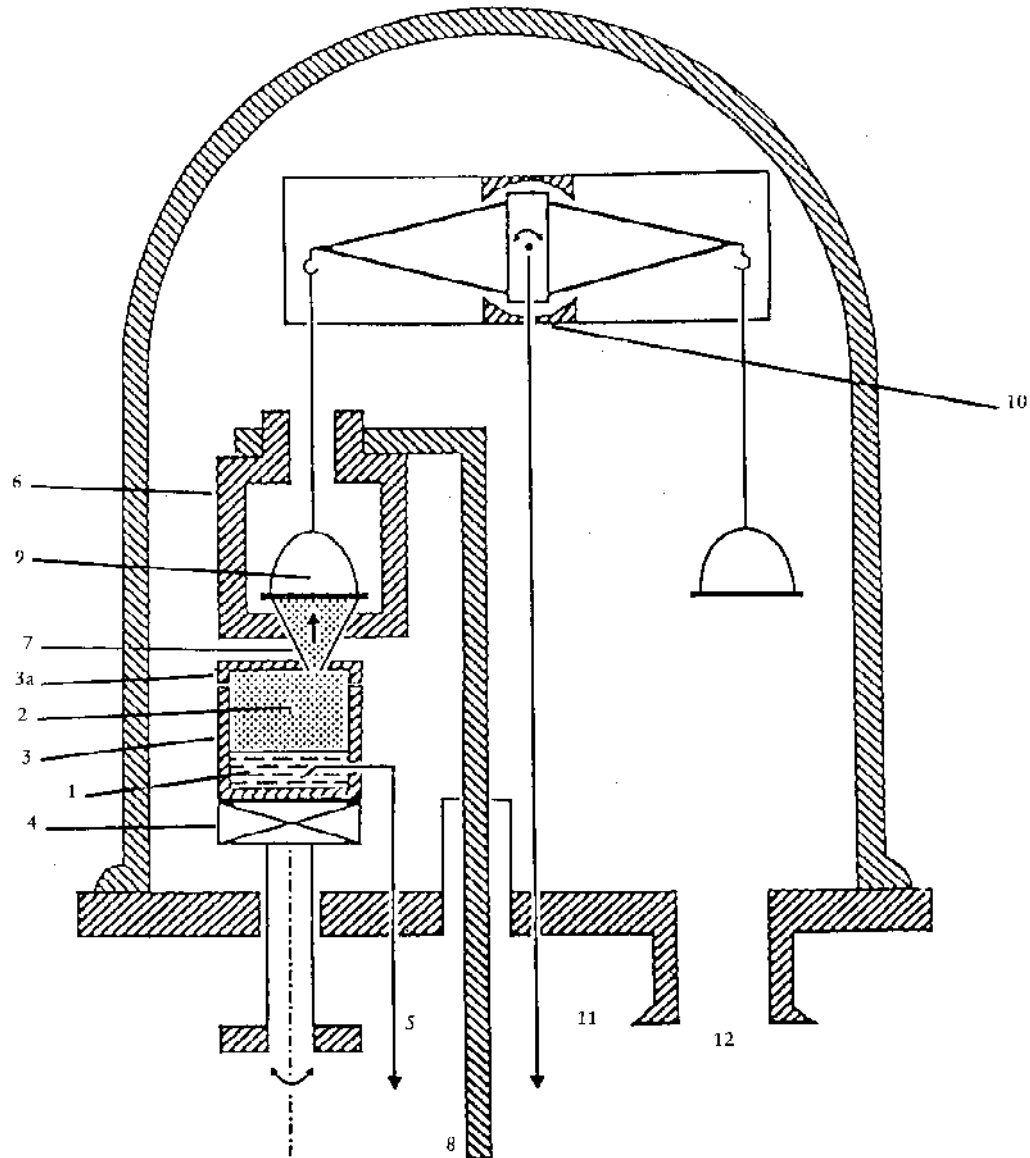
Figure 3
Isoténiscope (voir référence 2)



- 1 = Vers les systèmes de contrôle et de mesure de la pression
- 2 = Tube de 8 mm de diamètre extérieur
- 3 = Azote sec
- 4 = Vapeur de l'échantillon
- 5 = Petite pointe
- 6 = Échantillon liquide

Figure 4

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

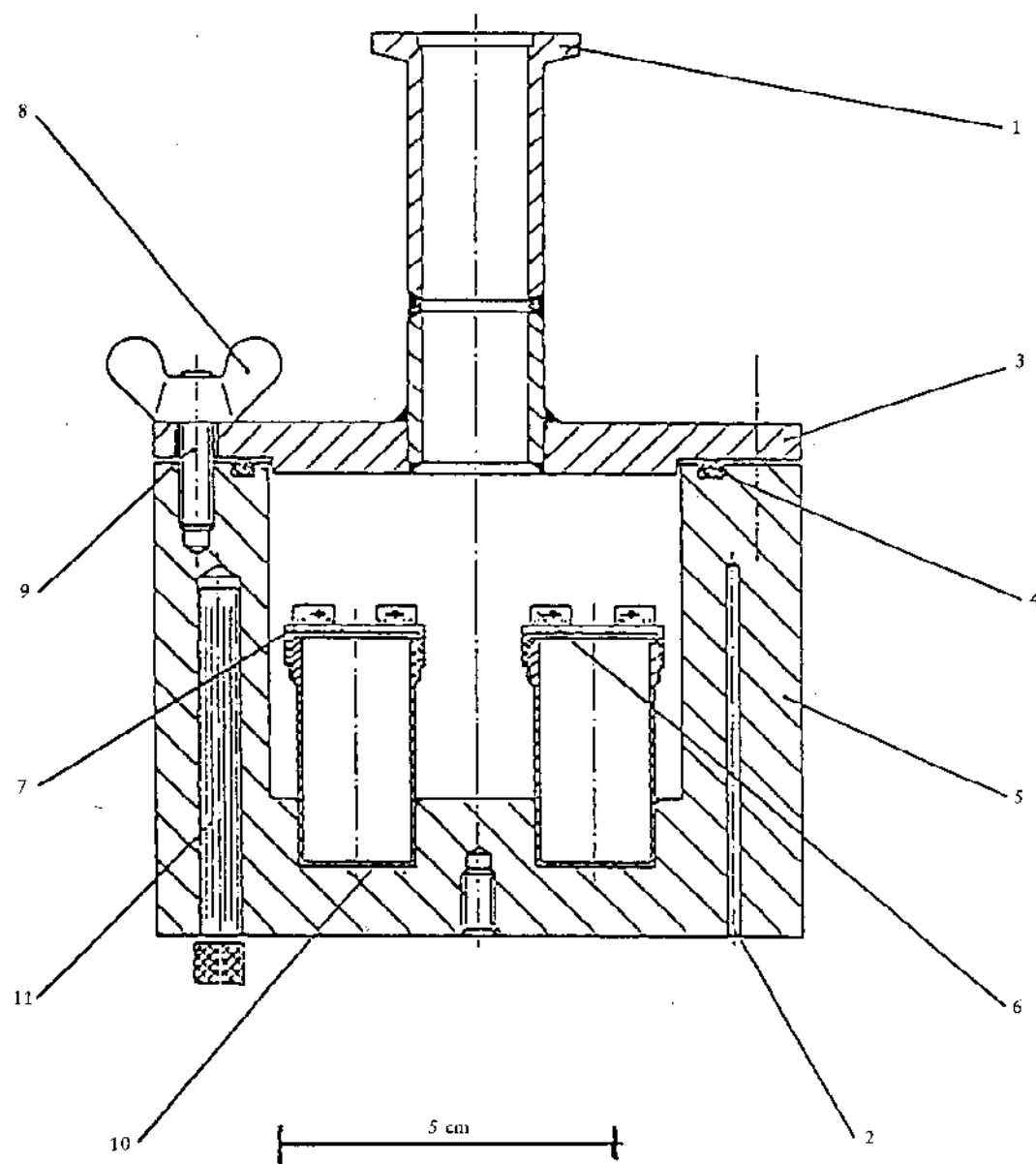


- 1 - Substance à étudier
- 2 - Vapeur avec jet de vapeur
- 3 - Four d'évaporation avec canal d'alimentation rotatif
- 3 a - Couvercle du four avec orifice
- 4 - Système de chauffage du four (réfrigération)
- 5 - Système de mesure de la température de l'échantillon
- 6 - Enceinte de réfrigération

- 7 = Bouclier
- 8 = Barre pour l'enceinte de réfrigération
- 9 = Plateau de balance
- 10 = Microbalance
- 11 = Vers l'enregistreur (réfrigération)
- 12 = Vers la pompe à vide poussé (réfrigération)
- 12 = Vers la pompe à vide poussé

Figure 5

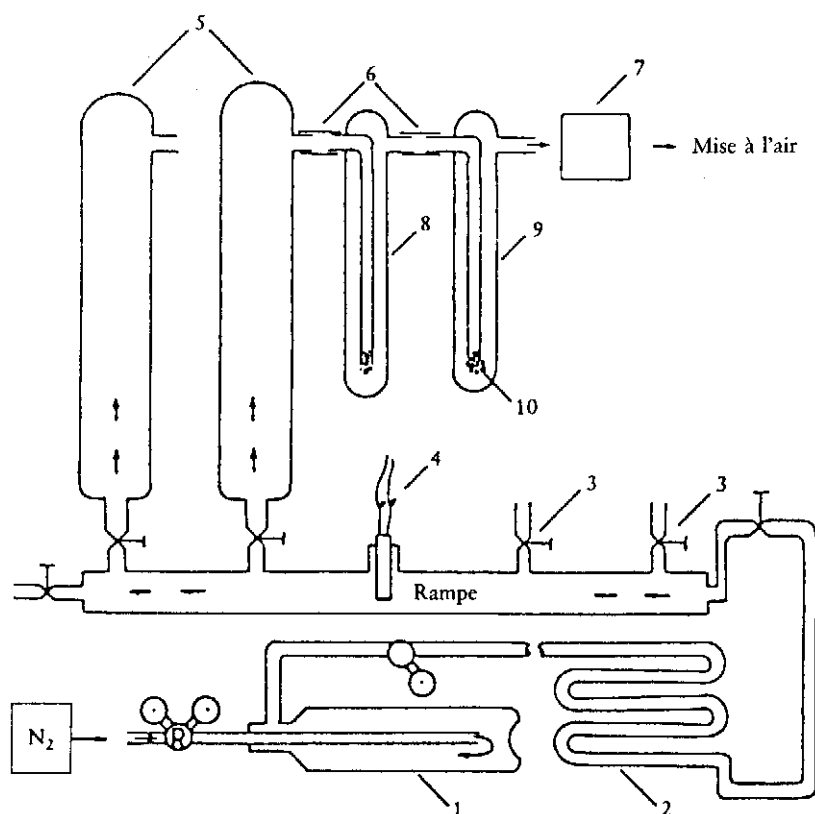
Modèle d'appareil pour l'évaporation à basse pression grâce à la méthode d'effusion, avec une cellule d'effusion d'un volume de 8 cm³



- 1 = Vers la pompe à vide
- 2 = Puits pour le thermomètre à résistance de platine ou pour les systèmes de mesure et de contrôle de la température (2)
- 3 = Couvercle du récipient à vide
- 4 = Anneau
- 5 = Enceinte à vide en aluminium
- 6 = Système d'accès aux cellules à effusion
- 7 = Couvercle fileté
- 8 = Ecrou à ailettes (6)
- 9 = Boulon (6)
- 10 = Cellules à effusion en acier inoxydable
- 11 = Cartouches de chauffage (6)

Figure 6a

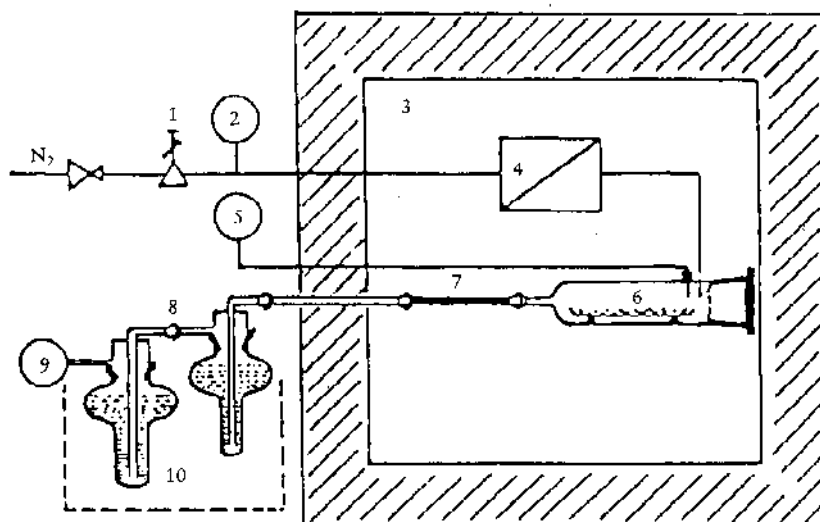
Exemple de système de débit permettant de déterminer la pression de vapeur par la méthode de saturation des gaz



- 1 = Régulateur de débit
- 2 = Échangeur de chaleur
- 3 = Vannes à pointeau
- 4 = Sondes d'humidité relative
- 5 = Colonnes de saturation
- 6 = Joints PTFE
- 7 = Débitmètre
- 8 = Collecteur (absorbant)
- 9 = Collecteur (huile)
- 10 = Fritté pour barbotage des gaz

Figure 6b

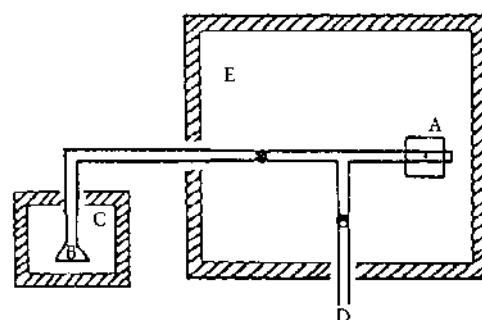
Modèle de système de détermination de la pression de vapeur par la méthode de saturation des gaz avec un capillaire placé après la chambre de saturation



- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1 = Débitmètre | 6 = Chambre de saturation des gaz |
| 2 = Manomètre | 7 = Tube capillaire |
| 3 = Enceinte thermostatée | 8 = Récipient de barbotage |
| 4 = Système de contrôle de la température du gaz porteur | 9 = Débitmètre |
| 5 = Thermomètre (pt 100) | 10 = Collecteur froid |

Figure 7

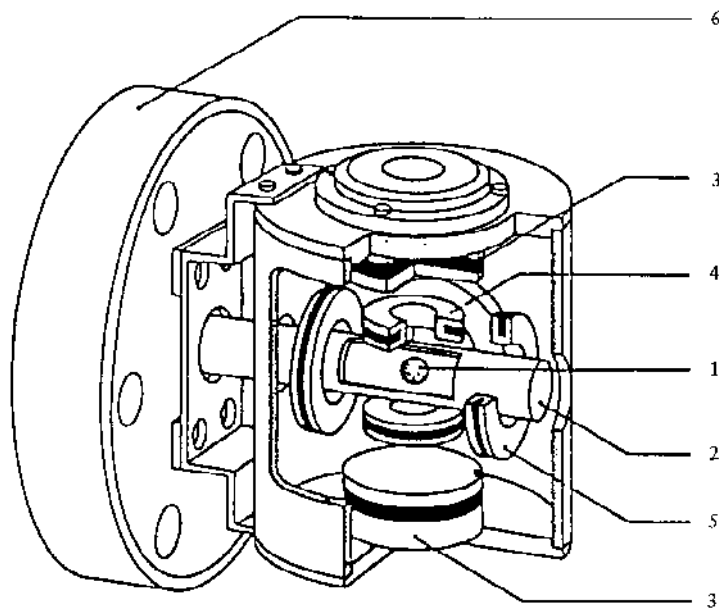
Exemple de dispositif expérimental pour la méthode du rotor



- Appareil de mesure de la pression de vapeur
- A. Tête de détection à rotor
 - B. Cellule contenant l'échantillon
 - C. Thermostat
 - D. Ligne vers la pompe à vide (pompe turbo)
 - E. Système de thermostatisation de la température de l'air

Figure 8

Modèle de tête de mesure à rotor



- 1 = Bille
- 2 = Extension tubulaire de 6 sous vide
- 3 = Aimants permanents (?)
- 4 = Bobines (2) de stabilisation verticale
- 5 = Bobines conductrices (4)
- 6 = Bride de connexion.

A. 5. TENSION SUPERFICIELLE

1. METHODE

Les méthodes décrites se basent sur les lignes directrices de l'OCDE (1). Leurs principes fondamentaux sont décrits dans la référence (2).

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 l'hydrosolubilité, la structure, les propriétés de la substance en matière d'hydrolyse et la concentration critique pour la formation de 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. DEFINITIONS ET UNITES

L'enthalpie libre de surface par unité de surface constitue la tension superficielle.

La tension superficielle s'exprime en :

N/m (en unités SI) ou

mN/m (en sous-unités SI)

1 N/m = 10³ dynes/cm

1 mN/m = 1 dyne/cm dans le système cgs qui n'est plus utilisé.

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

Des substances de référence couvrant une vaste gamme de tensions superficielles sont données dans les références (1) et (3).

1.4. PRINCIPE DES METHODES

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.

Les substances hydrosolubles à une concentration supérieure à 1 mg/ml sont testées en solution aqueuse à une seule concentration.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Ces méthodes fournissent une plus grande précision que ce qui est probablement requis pour le contrôle de la protection de l'environnement.

1.6. DESCRIPTION DES METHODES

La substance est dissoute dans de l'eau distillée à une concentration correspondant à 90 % de la saturation de l'hydrosolubilité de cette substance, si cette concentration excède 1 g/l, l'essai est effectué avec une concentration de 1 g/l. Les substances dont l'hydrosolubilité est inférieure à 1 mg/l n'ont pas besoin d'être testées.

1.6.1. Méthode de la plaque

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (Substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de films liquides).

1.6.2. Méthode de l'étrier

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (Substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de films liquides).

1.6.3. Méthode de l'anneau

Voir ISO 304 et NF T 73-060 (Substances tensioactives — détermination de la tension superficielle par arrachement de 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 étudier. 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 erreur limite de $\pm 0,1$ mg 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 une précision de 0,1 mN/m.

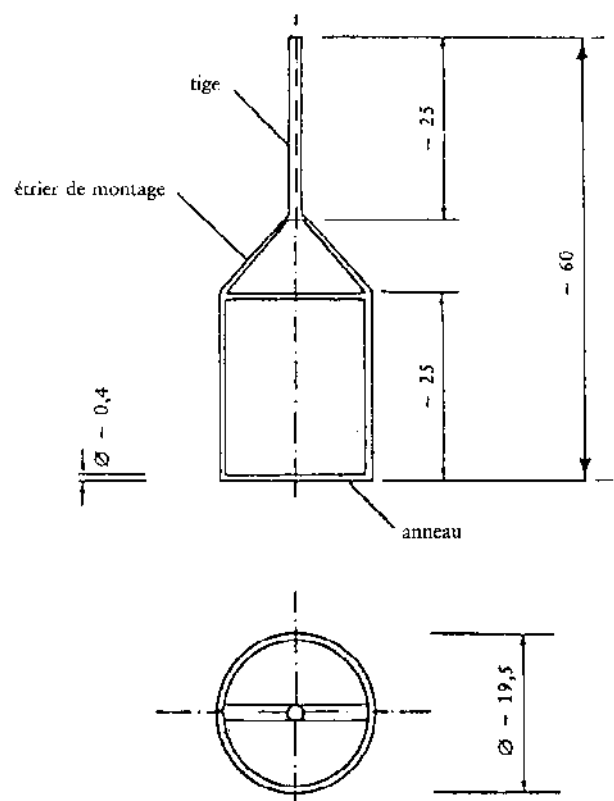
1.6.4.1.3. Corps de mesure (anneau)

L'anneau est habituellement constitué par un fil 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 thermostaté. Il doit être conçu de telle sorte que, au cours de la mesure, la température du liquide et de la phase gazeuse au-dessus de la 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*

La verrerie doit être nettoyée avec soin. Le cas échéant, elle sera lavée au mélange sulfochromique chaud puis à l'acide phosphorique sirupeux (83 à 98 % en poids de H_3PO_4), rincée abondamment à l'eau courante et ensuite à l'eau bidistillée jusqu'au moment où l'on obtient une réaction neutre, et, enfin, séchée ou bien rincée avec une partie du liquide à mesurer.

L'anneau sera tout d'abord rincé abondamment à l'eau pour éliminer toutes les traces de substances hydrosolubles, 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. *Etalonnage de l'appareil*

La validation 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 à l'aide d'un niveau à bulle placé sur le socle du tensiomètre, en ajustant des 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.

Etalonnage :

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 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:

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

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 substance tensioactive.

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):

$$\phi_b = \frac{\sigma_v}{\sigma_k} \quad (2)$$

où:

σ_v = valeur donnée dans la littérature pour la tension superficielle de l'eau (mN/m)

σ_k = 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 à tester 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). Etant donné que la tension superficielle d'une solution placée dans le récipient de mesure se modifie après un certain temps, il faut effectuer plusieurs mesures à des moments différents et tracer une courbe donnant la tension superficielle en fonction du temps. Lorsqu'il n'y a plus de modification, 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 supérieure à $\pm 0,5$ °C.

1.6.6. *Déroulement de l'essai*

Les solutions à mesurer seront transférées dans le récipient de mesure soigneusement nettoyé, 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 abaissé graduellement et uniformément (à une vitesse d'environ 0,5 cm/mn) pour retirer l'anneau de la surface du liquide et

ce, jusqu'à ce que la force maximale soit atteinte. La couche du liquide accroché à l'anneau ne doit pas s'en détacher. Une fois les mesures achevées, l'anneau sera immergé à nouveau sous la surface et les mesures répétées jusqu'à ce que l'on parvienne à une tension superficielle constante. A 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. DONNEES

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_a ou ϕ_b (selon la méthode d'étalonnage utilisée). On obtiendra alors une valeur qui n'est qu'une approximation et doit ensuite être corrigée.

Harkins et Jordan (4) 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.

Etant 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 méthode 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, $\rho \approx 1 \text{ g/cm}^3$

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 1.6.4.2.2.(a)]	Étalonnage à l'aide d'eau [voir 1.6.4.2.2.(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 mm (rayon moyen de l'anneau) et r = 0,185 mm (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 à calculer la tension superficielle, sans étalonnage préalable, 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 = la rayon de l'anneau

f = le facteur de correction (1)

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- méthode utilisée;
- le type d'eau ou de solution utilisé;
- les spécifications précises de la substance étudiée (identité et impuretés);
- le résultat des mesures : tension superficielle (lue) en indiquant à la fois les différentes lectures et leur moyenne arithmétique, ainsi que la valeur moyenne corrigée (compte-tenu du facteur dû au matériel 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 en fonction du temps à partir du moment où la solution a été transférée dans le récipient de mesure;
- toutes les informations et observations pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, notamment les impuretés et l'état physique de la substance.

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Etant donné que la tension superficielle de l'eau est de 72,75 mN/m à 20 °C, les substances dont la tension superficielle est inférieure à 60 mN/m, dans les conditions propres à cette méthode, doivent être considérées comme des produits tensioactifs.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice 115, décision du Conseil C(81) 30 Final.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of organic chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed, Interscience Publ. New York, 1959, Vol. 1, Part 1.
- (3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.
- (4) Harkins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6. HYDROSOLUBILITE

1. METHODE

Les méthodes décrites sont basées sur les lignes directrices 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 (en 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.

Les deux méthodes d'essai décrites ci-après permettent de couvrir toute la gamme des solubilités, mais elles ne sont pas applicables aux substances volatiles :

- la première, ci-après dénommée « 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, ci-après dénommée « 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 étudiée peut être considérablement affectée par la présence d'impuretés.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

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/m³ (g/l peut également être utilisé).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

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

1.4.1. Méthode par élution sur colonne

Cette méthode repose sur l'élution d'une substance à étudier avec de l'eau à partir d'une microcolonne remplie avec un support inerte, tel que des billes de verre ou du sable, chargé avec un excès de substance à étudier. L'hydrosolubilité est déterminée lorsque la concentration massique de l'éluant est constante. Elle est indiquée par un plateau de concentration en fonction du temps.

1.4.2. Méthode du flacon

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. Une autre possibilité consiste à effectuer la mesure directement à la température d'essai, si un échantillonnage approprié assure que l'équilibre de saturation est atteint. 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. CRITERES DE QUALITE

1.5.1. Répétabilité

La méthode par élution sur colonne permet d'obtenir une répétabilité < 30 %, et la méthode du flacon, une répétabilité < 15 %.

1.5.2. Sensibilité

La sensibilité dépend de la méthode d'analyse, mais la concentration massique peut être déterminée jusqu'à 10⁻⁶ grammes par litre.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Conditions de l'essai.

L'essai doit de préférence être effectué à $20\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Si l'on suspecte une incidence de la température sur 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 elle peut avoir une influence.

1.6.2. Essai préliminaire

Dans une éprouvette graduée et bouchée de 10 ml, ajouter à 0,1 g environ d'échantillon (les substances solides doivent être réduites en poudre) des volumes croissants d'eau distillée à température ambiante, suivant la progression indiquée dans le tableau suivant :

0,1 g soluble dans «x» ml d'eau	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilité approximative (grammes par litre)	> 1 000	1 000 à 200	200 à 100	100 à 50	50 à 10	10 à 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 parties d'échantillon non dissoutes. Si, après addition de 10 ml d'eau, l'échantillon, ou des parties de celui-ci, n'est pas dissous, répéter l'expérience dans une éprouvette de 100 ml avec de plus grands volumes d'eau. Si la solubilité est faible, le temps nécessaire pour dissoudre la substance peut être considérablement plus long (24 heures au moins sont à prévoir). La solubilité approximative est indiquée dans le tableau sous le volume d'eau ajoutée dans lequel s'effectue la dissolution complète de l'échantillon. Si la substance reste, selon toute apparence, insoluble, il faut augmenter le temps au-delà de 24 heures (96 heures au maximum), ou 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. Support, solvant et éluant

Dans la méthode par élution sur colonne, le matériel support doit être inerte. On peut employer des billes de verre et du sable. Pour appliquer la substance à tester au support, il faut utiliser un solvant volatil approprié de qualité analytique. L'eau bidistillée dans un appareil de verre ou de quartz peut être utilisée comme éluant.

Remarque :

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

1.6.3.2. Charge du support

Peser et transférer 600 mg environ de matériel support dans un ballon à fond rond de 50 ml.

Peser une quantité appropriée de substance à étudier et la dissoudre dans le solvant choisi. Une quantité déterminée de cette solution est ajoutée au support. Le solvant doit être complètement évaporé, par exemple dans un évaporateur rotatif, afin d'assurer la saturation en eau du support qui, sinon, ne se ferait pas en raison de l'effet de répartition à la surface.

La charge du support peut poser des problèmes (résultats erronés) si la substance à étudier est déposée sous forme d'huile ou d'une phase cristalline différente. Le problème devrait être examiné expérimentalement et décrit en détail dans le procès-verbal.

Laisser tremper le support chargé pendant au moins 2 heures dans environ 5 ml d'eau, puis transférer la solution dans la microcolonne. Une autre possibilité consiste à verser le support chargé sec dans une microcolonne préalablement remplie d'eau et à équilibrer pendant 2 heures environ.

Mode opératoire :

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

- pompe de recirculation (voir figure 1);
- réservoir d'eau (voir figure 4).

1.6.3.3. Méthode de colonne d'élution avec pompe de recirculation

Appareil

Le schéma d'un système couramment utilisé est indiqué sur 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 à cinq fois au moins le volume d'eau contenu dans le lit de la colonne et pouvoir contenir au moins cinq échantillons. On peut cependant réduire la dimension si l'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 recirculation, capable de donner un débit approximatif de 25 ml/heure environ, au moyen de raccords en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et/ou en 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. La pompe de recirculation peut être, par exemple, une pompe péristaltique ou une pompe à membrane (veiller à ce que la matière du tube ne cause aucune contamination et/ou adsorption).

Mesure :

La circulation dans la colonne est amorcée. Le débit recommandé est d'environ 25 ml/h (ce qui correspond à dix volumes de lit par heure pour la colonne décrite ici). Les cinq premiers volumes (minimum) sont écartés afin d'éliminer les impuretés solubles dans l'eau. Après quoi, faire fonctionner la pompe de recirculation jusqu'à atteindre l'état d'équilibre défini par cinq échantillons successifs dont les concentrations ne diffèrent pas de façon aléatoire de plus de $\pm 30\text{ %}$. Ces échantillons doivent être séparés l'un de l'autre par un intervalle de temps correspondant au passage d'un volume d'éluant équivalent à dix fois au moins le volume du lit de la colonne.

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 de verre rodé, lui-même raccordé à un tube en polytétrafluoroéthylène. Débit recommandé : environ 25 ml/h. Les fractions successives de l'éluant seront recueillies et analysées suivant la méthode choisie.

Mesure :

Les fractions provenant du milieu de l'intervalle d'élution où les concentrations sont constantes ($\pm 30\%$) dans au moins cinq fractions consécutives seront utilisées pour déterminer l'hydrosolubilité.

Dans les deux cas (pompe de recirculation ou réservoir d'eau) on répétera l'opération en réduisant le débit 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 d'eau), rechercher 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. Appareil

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 en présence d'émulsions, centrifugeuse (de préférence thermostatée);
- équipement pour la détermination analytique.

1.6.4.2. Mesure

Evaluer, à partir de l'essai préliminaire, la quantité de produit nécessaire pour saturer le volume d'eau choisi. 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 trois récipients en verre pourvus d'un bouchon, également en verre (par exemple, flacons ou tubes à centrifuge). 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 équilibrage 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'équilibrage plus longs si les résultats des récipients 1, 2 et 3 accusent une tendance à la progression.

La mesure peut également être effectuée sans préincubation à 30 °C. Pour estimer la vitesse à laquelle s'établit l'équilibre de saturation, prélever des échantillons jusqu'à ce que le temps d'agitation n'ait plus d'effet sur la concentration de la solution à étudier.

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. DONNEES

2.1. METHODE PAR ELUTION 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. Les résultats doivent être exprimés en unités de masse par volume de solution.

La comparaison des moyennes calculées sur deux essais effectués avec des débits différents doit donner une répétabilité inférieure à 30 %.

2.2. METHODE DU FLACON

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

3. RESULTATS

3.1. METHODE PAR ELUTION SUR COLONNE

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

- résultats de l'essai préliminaire;
- spécification précise de la substance (identité et impuretés);
- concentrations individuelles, débits et pH de chaque échantillon;
- moyenne et déviation standard d'au moins cinq échantillons provenant du plateau de saturation pour chaque opération;
- moyenne de deux opérations acceptables consécutives;
- température de l'eau pendant le processus de saturation;
- méthode d'analyse utilisée;
- nature du matériel employé comme support;
- charge du support;

- solvant utilisé;
- signe d'instabilité chimique éventuelle de la substance pendant l'essai et la méthode utilisée;
- toute information pertinente pour l'interprétation des résultats, notamment les impuretés et l'état physique de la substance.

3.2. METHODE DU FLACON

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

- résultats de l'essai préliminaire;
- spécification précise de la substance (identité et impuretés);
- résultats analytiques individuels et moyenne lorsque plus d'une valeur est déterminée pour un même flacon;
- pH de chaque échantillon;
- moyenne des valeurs pour les différents flacons en concordance;
- température d'essai;
- méthode analytique utilisée;
- signe d'instabilité chimique éventuelle de la substance pendant l'essai et la méthode utilisée;
- toute donnée pertinente pour l'interprétation des résultats, notamment les impuretés et l'état physique de la substance.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 105, Décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à faible solubilité — Méthode de l'éluion sur colonne.
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la solubilité dans l'eau des solides et liquides à faible solubilité — Méthode du flacon.

Annexe

Figure 1

Méthode par éluion sur colonne avec pompe de recirculation

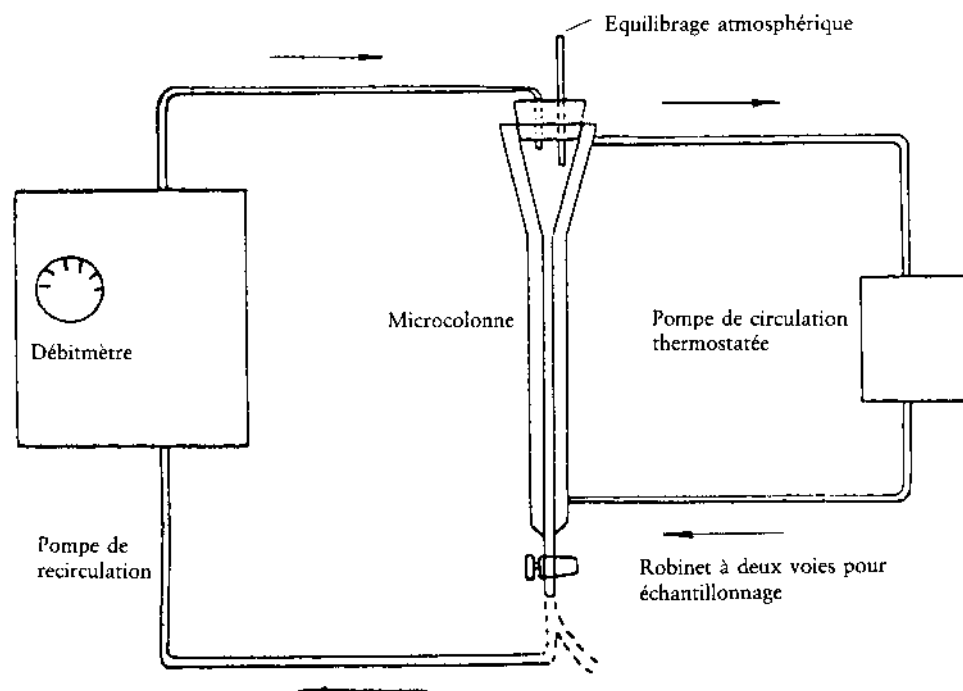


Figure 2
Microcolonne type
(dimensions en millimètres)

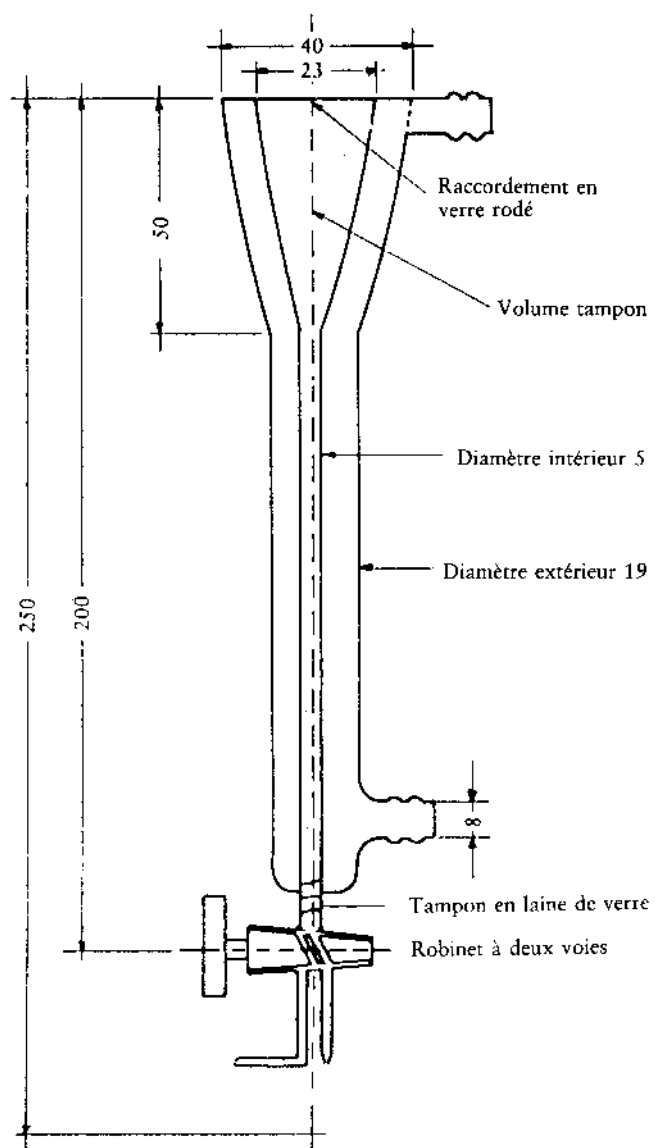


Figure 3
Microcolonne type
(dimensions en millimètres)

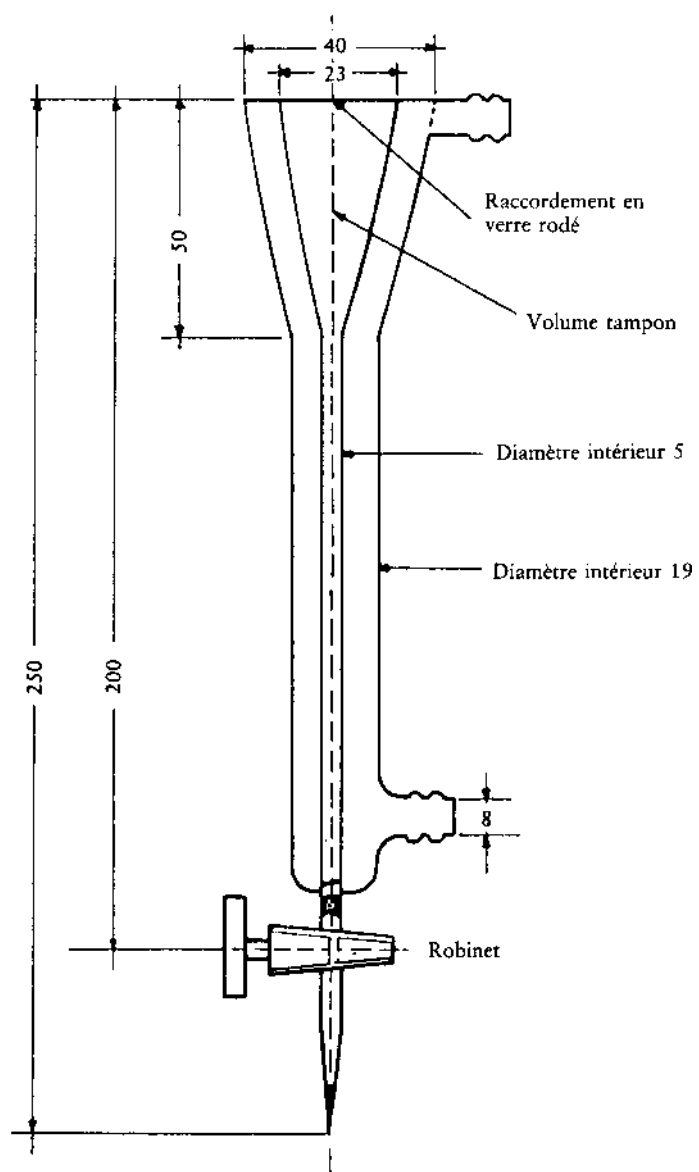
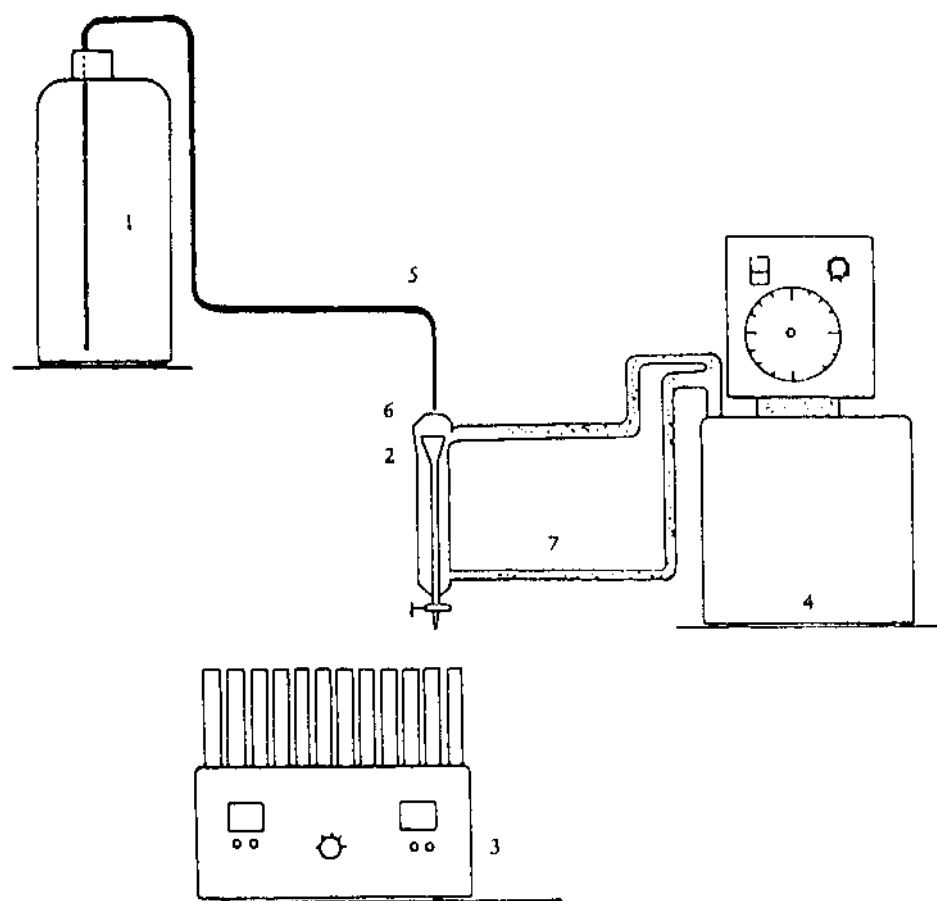


Figure 4
Colonne d'élution avec réservoir d'eau



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

A.8. COEFFICIENT DE PARTAGE

1. METHODE

La méthode par « agitation en flacon » décrite est basée sur les lignes directrices de l'OCDE (1).

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la formule développée, la constante de dissociation, l'hydrosolubilité, l'hydrolyse, la solubilité dans le n-Octanol et la tension superficielle de la substance pour exécuter cet essai.

Les mesures concernant les substances ionisables ne doivent être réalisées qu'avec leur forme non ionisée (acide libre ou base libre) obtenue à l'aide d'un tampon approprié dont le pH est inférieur (acide libre) ou supérieur (base libre) au pK, au moins d'une unité pH.

La présente méthode d'essai comporte deux techniques distinctes : la méthode par agitation en flacon et la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC). La première est applicable lorsque la valeur de $\log P_{ow}$ (voir définition ci-après) tombe dans l'intervalle compris entre -2 et 4, et la seconde dans l'intervalle compris entre 0 et 6. Avant d'effectuer l'une de ces techniques expérimentales, il y a lieu de procéder à une estimation préliminaire du coefficient de partage.

La méthode par agitation en flacon ne s'applique qu'aux substances essentiellement pures, solubles dans l'eau et dans le n-Octanol. Elle n'est pas applicable aux substances tensioactives (pour lesquelles il convient de fournir une valeur calculée ou une estimation fondée sur les solubilités individuelles dans l'eau et le n-Octanol).

La méthode de HPLC ne s'applique pas aux acides et aux bases forts, aux complexes métalliques, aux substances tensioactives et aux substances qui réagissent avec l'éluant. Pour ces produits, il convient de fournir une valeur calculée ou une estimation fondée sur les solubilités individuelles dans l'eau et le n-Octanol.

La méthode de HPLC est moins sensible à la présence d'impuretés dans le composé à tester que la méthode par agitation en flacon. Les impuretés peuvent toutefois, dans certains cas, compliquer l'interprétation des résultats en rendant incertaine l'identification des pics. Pour des mélanges qui donnent des pics non résolus, il faut noter la limite inférieure et la limite supérieure de $\log P$.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

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 du n-Octanol et de l'eau :

$$P_{ow} = \frac{c_{n\text{-Octanol}}}{c_{\text{eau}}}$$

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 REFERENCE

Méthode par agitation en flacon

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles doivent servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

Méthode de HPLC

Pour établir une corrélation entre les données mesurées par HPLC et le coefficient de partage d'un composé, il faut établir une courbe d'étalonnage de $\log P$ par rapport aux données chromatographiques, à l'aide de six points de référence au moins. Le choix des substances de référence appropriées est laissé à l'utilisateur. Au moins un des composés de référence doit, si possible, avoir un P_{ow} supérieur, et un autre un P_{ow} inférieur à celui de la substance à étudier. Pour des valeurs de $\log P$ inférieures à 4, l'étalonnage peut reposer sur les données obtenues avec la méthode par agitation en flacon. Pour des valeurs de $\log P$ supérieures à 4, l'étalonnage peut être effectué à partir de valeurs validées citées dans la littérature, si celles-ci concordent avec des valeurs calculées. Il est préférable, pour une plus grande précision, de choisir des composés de référence dont la structure est apparentée à celle de la substance à étudier.

Des listes de valeurs de $\log P$ ont été établies pour un grand nombre de produits chimiques (2)(3). Si l'on ne dispose pas de données relatives au coefficient de partage de composés de structures voisines, il faut utiliser un étalonnage plus général, établi avec d'autres composés de référence.

L'annexe II présente une liste de substances de référence recommandées et la valeur de leur P_{ow} .

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

1.4.1. Méthode par agitation en flacon

Pour déterminer un coefficient de partage, il faut parvenir à un équilibre entre l'ensemble des éléments constitutifs du système s'influencent mutuellement et déterminer les concentrations des substances dissoutes dans les deux phases. Une étude bibliographique sur ce sujet fait apparaître que plusieurs techniques différentes permettent de résoudre ce problème, à savoir le mélange complet de deux phases suivi de leur séparation dans le but de déterminer la concentration à l'équilibre de la substance étudiée.

1.4.2. Méthode de HPLC

La HPLC est effectuée sur des colonnes analytiques remplies d'une phase solide contenant de longues chaînes d'hydrocarbures (par exemple C8, C18) liées chimiquement à de la silice, vendue dans le commerce. Les produits chimiques déposés sur une telle colonne se déplacent sur toute sa longueur à des vitesses différentes en raison de leur différence de taux de partage entre la phase mobile et la phase fixe hydrocarbonée. Les mélanges de produits chimiques sont élués par ordre d'hydrophobicité : les produits hydrosolubles sont élués les premiers et les produits liposolubles, les derniers, proportionnellement à leur coefficient de partage entre l'eau et les hydrocarbures. Ainsi peut-on établir une relation entre le temps de rétention sur une telle colonne (à phase inversée) et le coefficient de partage n-Octanol/eau. Le coefficient de partage est déduit du facteur de capacité k , défini par l'expression suivante :

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

où t_R = temps de rétention de la substance à étudier et t_0 = temps moyen nécessaire à une molécule de solvant pour traverser la colonne (temps mort).

Il n'est pas nécessaire de disposer d'une méthode analytique quantitative; il suffit de déterminer les temps d'éluion.

1.5. CRITÈRES DE QUALITE

1.5.1. Répétabilité

Méthode par agitation en flacon

Pour garantir la précision du coefficient de partage, on doit procéder à des déterminations en double, dans trois conditions d'essai différentes, la quantité de substance spécifiée ainsi que le rapport des volumes de solvant pouvant être modifiés. 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.

Méthode de HPLC

Afin d'augmenter la fiabilité des mesures, on procédera à des déterminations en double. Les valeurs de log P issues de mesures individuelles doivent se situer dans un intervalle de $\pm 0,1$ unité log.

1.5.2. Sensibilité

Méthode par agitation en flacon

L'intervalle de mesure de la méthode est déterminé par la limite de détection du procédé analytique. Celle-ci doit permettre de déterminer les valeurs de log P_{ow} dans l'intervalle de -2 à 4 (cet intervalle peut occasionnellement, lorsque les conditions le permettent, être étendu à des valeurs de log P_{ow} allant jusqu'à 5) lorsque la concentration du soluté n'excède pas 0,01 mol par litre dans l'une ou l'autre phase.

Méthode de HPLC

La méthode de HPLC permet d'estimer des coefficients de partage dans une gamme de valeurs de log P_{ow} comprises entre 0 et 6.

Normalement, le coefficient de partage d'un composé peut être estimé avec une précision de ± 1 unité log de la valeur obtenue avec la méthode par agitation en flacon. On peut trouver des exemples de corrélations dans la littérature (4)(5)(6)(7)(8). Une plus grande précision peut généralement être obtenue lorsque la courbe de corrélation est établie avec des composés de référence de structure voisine (9).

1.5.3. Spécificité

Méthode par agitation en flacon

La loi de partage de Nernst ne s'applique qu'à température, pression et pH constants pour les solutions diluées. Rigoureusement, elle ne s'applique qu'à une substance 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. Dans ce cas, il faut envisager de remplacer l'eau par des solutions tampons dont le pH doit être distant d'au moins une unité pH du pKa de la substance; il faut tenir compte de l'importance de ce pH pour l'environnement.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Estimation préliminaire du coefficient de partage

La valeur du coefficient de partage est estimée de préférence à l'aide d'une méthode de calcul (voir annexe 1), ou bien, s'il y a lieu, à partir du rapport des valeurs de solubilité de la substance à étudier dans des solvants purs (10).

1.6.2. Méthode par agitation en flacon

1.6.2.1. 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 dans un appareil de verre ou de quartz. Pour les composés ionisables, remplacer, si c'est justifié, l'eau par des solutions tampons.

Note :

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

1.6.2.1.1. 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 vingt-quatre 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 un état de saturation.

1.6.2.1.2. Préparation de 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 à tester requise par le procédé analytique utilisé;
- limite de concentration maximale dans chaque phase de 0,01 mol par litre.

Trois essais sont effectués. Pour le premier, on utilise le rapport n- Octanol/eau calculé, pour le second, ce rapport est réduit de moitié et pour le troisième, il est doublé (par exemple 1 :1, 1 :2, 2 :1).

1.6.2.1.3. Substance à étudier

Une solution de réserve est préparée dans du n-Octanol présaturé d'eau. La concentration de cette solution mère doit être déterminée avec précision avant de l'utiliser pour déterminer le coefficient de partage. Cette solution doit être stockée dans des conditions qui garantissent sa stabilité.

1.6.2.2. Conditions de l'essai

La température d'essai doit être maintenue constante (± 1 °C) et se situer dans l'intervalle compris entre 20 °C et 25 °C.

1.6.2.3. *Mesure*

1.6.2.3.1. Etablissement de l'équilibre de partage

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

Mesurer le volume des phases de n-Octanol. Placer les récipients d'essai dans un agitateur approprié ou les agiter à la main. Lorsqu'on utilise un tube à centrifuger, une méthode recommandée consiste à retourner rapidement le tube à 180° autour de son axe transversal de telle sorte que l'air éventuellement retenu traverse les deux phases. L'expérience a montré que cinquante rotations de ce type suffisent généralement pour établir l'équilibre de partage. Pour plus de certitude, il est recommandé d'effectuer cent rotations en cinq minutes.

1.6.2.3.2. Séparation des phases

On peut, si nécessaire, centrifuger le mélange pour séparer les phases. Cette opération est effectuée à l'aide d'une centrifugeuse de laboratoire maintenue à température ambiante, ou, si l'on utilise une centrifugeuse sans contrôle de température, les tubes à centrifuger doivent être gardés à température d'essai pendant au moins une heure avant l'essai.

1.6.2.4. *Analyse*

Pour déterminer le coefficient de partage, il est nécessaire de déterminer la concentration de la substance à étudier 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 de n-Octanol : on peut utiliser à cet effet une seringue en verre à aiguille interchangeable. Tout d'abord remplir partiellement la seringue d'air, lequel est ensuite expulsé doucement, tout en insérant l'aiguille dans la couche de 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 doit être déterminée dans les deux phases distinctes de préférence par un procédé spécifique à la substance. Exemples de méthodes analytiques susceptibles de convenir :

- méthodes photométriques;
- chromatographie en phase gazeuse;
- chromatographie en phase liquide haute performance.

1.6.3. **Méthode HPLC**

1.6.3.1. *Préparation*

Appareil

Il est nécessaire de disposer d'un chromatographe à phase liquide, muni d'une pompe à débit régulier et d'un dispositif de détection approprié. Il est recommandé d'utiliser une valve à injection portant des boucles à injection. La présence de groupes polaires dans la phase stationnaire peut entraver considérablement le fonctionnement de la colonne d'HPLC. C'est pourquoi les phases stationnaires doivent contenir un minimum de groupes polaires (11). On peut utiliser des phases inverses à microparticules ou des colonnes prêtes à l'emploi vendues dans le commerce. Une colonne de sécurité peut être placée entre le système d'injection et la colonne analytique.

Phase mobile

Le solvant d'éluion est préparé avec du méthanol et de l'eau de qualité HPLC et dégazé avant utilisation. Il convient d'employer une éluion isocratique et d'utiliser un rapport méthanol/eau contenant un minimum de 25 % d'eau. Normalement, un mélange méthanol-eau 3 :1 (v/v) convient pour éluer des composés de log P 6 en moins d'une heure, à un débit de 1 millilitre/minute. Pour les composés dont le log P est élevé, il peut être nécessaire de réduire le temps d'éluion et celui des composés de référence en diminuant la polarité de la phase mobile ou la longueur de la colonne.

Les substances très peu solubles dans le n-Octanol ont tendance à donner des valeurs de log P_{ow} anormalement basses avec la méthode HPLC; les pics formés par ces composés font parfois partie du front du solvant. Ce phénomène est probablement dû au fait que le processus de partage est trop lent pour atteindre l'équilibre dans un laps de temps normal pour une séparation par HPLC. Pour parvenir à une valeur fiable, il peut être utile de diminuer le débit ou le rapport méthanol/eau.

Les substances à tester et les composés de référence doivent être solubles, dans la phase mobile, à des concentrations suffisantes pour permettre leur détection. On ne peut employer d'additifs avec le mélange méthanol-eau que dans des cas exceptionnels, car ils modifient les propriétés de la colonne. Les chromatogrammes avec additifs doivent obligatoirement être effectués avec une autre colonne du même type. Si le mélange méthanol-eau n'est pas approprié, on peut utiliser d'autres mélanges solvant organique-eau, par exemple éthanol-eau ou acétonitrile-eau.

Le pH de l'éluant est d'une importance capitale pour les composés ionisables. Il doit se situer dans l'intervalle de pH auquel fonctionne la colonne, qui est habituellement compris entre 2 et 8. Il est recommandé de tamponner. Il faut prendre soin d'éviter la précipitation saline et la détérioration de la colonne qui se produisent avec certains mélanges phase organique/tampon. Il n'est pas recommandé d'effectuer des mesures de HPLC avec des phases stationnaires à base de silice à un pH supérieur à 8 parce qu'une phase mobile alcaline peut altérer rapidement le fonctionnement de la colonne.

Solutés

Les composés de référence doivent être les plus purs possibles. Les composés utilisés à des fins d'essai ou d'étalonnage sont, si possible, dissous dans la phase mobile.

Conditions de l'essai

La température ne doit pas varier de plus de ± 2 K pendant les mesures.

1.6.3.2. *Mesure*Calcul du temps mort t_0

Le temps mort t_0 peut être déterminé en utilisant soit une série d'homologues (par exemple n-alkyl-méthyl-cétones) soit des composés organiques non retenus (par exemple thiourée ou formamide). Pour calculer le temps mort (t_0) à l'aide d'une série homologue, il faut injecter un jeu d'au moins 7 membres d'une série homologue et déterminer leurs temps de rétention respectifs. Les temps de rétention bruts $t_{r(n_c + 1)}$ sont tracés en fonction de $t_{r(n_c)}$. L'intersection a et la pente b de l'équation de régression:

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

sont déterminés (n_c = nombre d'atomes de carbone). Le temps mort est défini par l'équation suivante:

$$t_0 = a / (1 - b)$$

Courbe d'étalonnage

L'étape suivante consiste à construire une courbe de corrélation entre $\log k$ et $\log P$ pour des composés de référence appropriés. En pratique, il s'agit d'injecter simultanément un jeu de cinq à dix composés de référence standard dont le $\log P$ est proche de la gamme prévue et de déterminer les temps de rétention, de préférence sur un intégrateur enregistreur lié au système de détection. Les logarithmes des facteurs de capacité, $\log k$, correspondants sont calculés et tracés en fonction du $\log P$ déterminé avec la méthode par agitation en flacon. L'étalonnage est effectué à intervalles réguliers, au moins une fois par jour, afin de pouvoir tenir compte de changements éventuels du fonctionnement de la colonne.

Détermination du facteur de capacité de la substance à tester

Injecter la substance à tester dans une quantité aussi petite que possible de phase mobile. Déterminer (en double) le temps de rétention qui permet de calculer le facteur de capacité k . Le coefficient de partage de la substance à tester peut être déduit par interpolation à partir de la courbe de corrélation des produits de référence. Une extrapolation s'impose pour les coefficients de partage très faibles ou très élevés. Il faut alors accorder une attention particulière aux limites de confiance de la courbe de régression.

2. DONNEES*Méthode par agitation en flacon*

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

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés) et, s'il y a lieu, l'étape de purification préliminaire;
- si les méthodes ne sont pas applicables (par exemple substance tensioactive), il convient de fournir une valeur calculée ou estimée à partir des solubilités individuelles dans l'eau ou le n-Octanol;
- toutes les informations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats doivent être signalées, en particulier les impuretés et l'état physique de la substance.

Pour la méthode par agitation en flacon :

- les résultats de l'estimation préliminaire, s'il y a lieu;
- la température à laquelle est effectuée la détermination;
- les données relatives aux procédés analytiques utilisés pour déterminer les concentrations;
- le temps et la vitesse de centrifugation, s'il y a lieu;
- les concentrations mesurées dans les deux phases pour chaque détermination (cela signifie qu'un total de douze concentrations doit être consigné);
- le poids de la substance à étudier, le volume de chaque phase utilisée dans chaque récipient à essai et la quantité totale calculée de substance à étudier présente dans chaque phase une fois l'équilibre atteint;
- les valeurs calculées du coefficient de partage (P) et la moyenne doivent être mentionnées pour chaque série de conditions d'essai ainsi que la moyenne de l'ensemble des déterminations. Toute indication de dépendance du coefficient de partage vis-à-vis de la concentration doit être mentionnée;
- la déviation standard des valeurs individuelles de P par rapport à leur moyenne;
- la moyenne P de l'ensemble des déterminations exprimée par son logarithme (base 10);
- la valeur théorique calculée de P_{ow} , si elle a été déterminée, ou si la valeur mesurée est $> 10^4$;
- le pH de l'eau utilisée et de la phase aqueuse pendant l'expérience;
- si l'eau est remplacée par un tampon, justifier son utilisation, et donner sa composition sa concentration et son pH ainsi que le pH de la phase aqueuse avant et après l'expérience.

Pour la méthode par HPLC :

- le résultat de l'estimation préliminaire, s'il y a lieu;
- les substances à étudier et les substances de référence ainsi que leur degré de pureté;
- la gamme de température à laquelle sont effectuées les déterminations;
- le pH auquel sont effectuées les déterminations;
- une description détaillée de la colonne analytique et de la colonne de sécurité ainsi que de la phase mobile et des moyens de détection;
- des données relatives à la rétention et les valeurs de $\log P$ citées dans la littérature pour les composés de référence utilisés pour l'étalonnage;
- une description détaillée de la ligne de régression ajustée ($\log k$ en fonction de $\log P$);
- des données relatives à la rétention moyenne et à la valeur interpolée de $\log P$ pour le composé à étudier;

- une description du matériel et des conditions expérimentales;
- les profils d'élution;
- les quantités de produit à étudier et de substances de référence introduites dans la colonne;
- le temps mort et la méthode utilisée pour le calculer.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 107, Décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (3) Log P and Parameter Database, A tool for quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundstrom and K. Dundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- (5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.
- (6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- (7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- (8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.
- (9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
- (10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (édité par E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, 223- 339.
- (11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.
- (12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses, Chem Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination du coefficient de partage — Méthode par agitation en flacon.
- (15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- (16) A. Leo, C.Hansch and D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.
- (17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
- (18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.
- (19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.
- (20) J.K. Seydei and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York, 1979.
- (21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- (22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, New York, Basel, 1978.
- (23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

Annexe

Méthodes de calcul/estimation

INTRODUCTION

Une introduction générale aux méthodes de calcul des données et des exemples figurent dans le « Handbook of Chemical Property Estimation Methods » (a).

Les valeurs calculées du P_{ow} peuvent servir :

- à choisir la méthode expérimentale appropriée (gamme pour la méthode par agitation du flacon : $\log P_{ow}$ de -2 à 4 T; gamme pour l'HPLC : $\log P_{ow}$ de 0 à 6);
- à déterminer les conditions d'essai appropriées (par exemple, les substances de référence pour l'HPLC, le rapport de volume n-Octanol/eau pour la méthode par agitation du flacon);
- de contrôle propre au laboratoire relatif aux erreurs expérimentales éventuelles;
- à fournir une estimation de P_{ow} au cas où les méthodes expérimentales ne peuvent être appliquées pour des raisons techniques.

METHODES D'ESTIMATION

Estimation préliminaire du coefficient de partage

La valeur du coefficient de partage peut être estimée à l'aide de la solubilité de la substance à tester dans les solvants purs :

$$P_{\text{estimé}} = \frac{\text{saturation } c_{n\text{-Octanol}}}{\text{saturation } c_{\text{eau}}}$$

METHODES DE CALCUL

Principe des méthodes de calcul

Toutes les méthodes de calcul reposent sur la fragmentation formelle de la molécule en sous-structures appropriées pour lesquelles on dispose de données précises concernant le $\log P_{ow}$. Le $\log P_{ow}$ de la molécule entière est alors calculé en ajoutant la somme des valeurs des fragments correspondantes et la somme des termes de correction pour les interactions moléculaires.

Il existe des listes de constantes de fragments et de termes de correction (b)(c)(d)(e) dont certaines sont régulièrement mises à jour (b).

Critères de qualité

En général, la fiabilité de la méthode de calcul est inversement proportionnelle à la complexité du composé étudié. Dans le cas de molécules simples, dont le poids moléculaire est faible et qui contiennent un ou deux groupes fonctionnels, on peut prévoir une déviation de 0,1 à 0,3 unité de log P entre les résultats obtenus à l'aide de différentes méthodes de fragmentation et la valeur mesurée. La marge d'erreur peut être plus importante dans le cas de molécules plus complexes. Cette marge d'erreur dépend de l'existence des constantes de fragments et de leur fiabilité ainsi que de la possibilité d'identifier les interactions intramoléculaires (par exemple les liaisons hydrogènes) et de l'utilisation correcte des termes de correction (ce qui ne pose aucune difficulté avec un logiciel informatique CLOGP-3) (b). Dans le cas des composés ionisables, il est important de prendre en considération la charge ou le degré d'ionisation.

Calcul

Méthode π de Hansch

La constante du substituant hydrophobe d'origine, π , établie par Fujita et al. (f) est définie comme suit:

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

où $P_{ow}(\text{PhX})$ est le coefficient de partage d'un dérivé aromatique et $P_{ow}(\text{PhH})$, celui du composé parent;

$$\begin{aligned} \text{(par exemple } \pi_{Cl} &= \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) \\ &= 2,84 - 2,13 = 0,71). \end{aligned}$$

Conformément à sa définition la méthode π s'applique surtout à la substitution aromatique. Les valeurs de π d'un grand nombre de substituants ont été rassemblées (b)(c)(d). Elles sont utilisées pour calculer le log P de molécules aromatiques ou de sousstructures.

Méthode de Rekker

Selon Rekker (g), la valeur de $\log P_{ow}$ est calculée de la manière suivante:

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

où f_i représente les constantes des divers fragments moléculaires et a_i leur fréquence dans la molécule à l'étude. Les termes de corrections peuvent être exprimés sous la forme du multiple entier d'une constante unique C_m (appelée «constante magique»). Les constantes de fragments f_i et C_m ont été déterminées à partir d'une liste de 1 054 valeurs de P_{ow} obtenues expérimentalement (825 composés) à l'aide d'une analyse de régression multiple (c)(h). La détermination des termes d'interaction est effectuée conformément aux règles établies décrites dans la littérature (e)(h)(i).

Méthode de Hansch-Leo

Selon Hansch et Leo (c), la valeur de $\log P_{ow}$ est calculée à l'aide de l'équation suivante:

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

où f_i représente les constantes des divers fragments moléculaires, F_j les termes de correction et a_i et b_j les fréquences correspondantes. Une liste de valeurs de fragments (atomes ou groupes) a été déterminée par essai et erreur à partir de valeurs expérimentales de P_{ow} , ainsi qu'une liste de termes de correction F_j (appelés «facteurs»). Les termes de correction ont été classés en plusieurs classes (a)(c). Il est relativement long et compliqué de tenir compte de toutes les règles et de tous les termes de correction mais des logiciels ont été mis au point (b).

Méthode mixte

Le calcul de $\log P_{ow}$ pour des molécules complexes peut être considérablement amélioré si l'on découpe la molécule en infrastructures de plus grande dimension, pour lesquelles on dispose de valeurs de $\log P_{ow}$ fiables, provenant soit de tableaux (b)(c) soit de mesures. De tels fragments (par exemple des hétérocycles, anthraquinone, azobenzène) peuvent être associés avec les valeurs de π définies selon Hansch ou avec les constantes de fragments définies par Rekker ou par Leo.

Observations

i) Les méthodes de calcul ne s'appliquent qu'à des composés partiellement ou totalement ionisés lorsqu'il est possible de tenir compte des facteurs de correction nécessaires.

ii) Si les liaisons hydrogène intramoléculaires peuvent être déterminées, les termes de correction correspondants (de + 0,6 à + 1,0 unité $\log P$) doivent être ajoutés (a). Les modèles stériques ou les données spectroscopiques relatives à la molécule peuvent indiquer la présence de telles liaisons.

iii) Si plusieurs formes tautomériques sont possibles, les calculs doivent être basés sur la forme la plus probable.

iv) Les révisions des listes de constantes de fragments doivent être soigneusement suivies.

Procès-verbal

Lors de l'utilisation de méthodes de calcul/estimation. Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

- description de la substance (mélange, impuretés, etc.);
- indication concernant toute liaison hydrogène intramoléculaire possible, charge, ou tout effet inhabituel (par exemple tautomérisme);
- description de la méthode de calcul;
- identification ou base de données;
- particularités du choix des fragments;
- documentation détaillée du calcul.

REFERENCES

- (a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- (b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.—Chim Ther., 1979, vol. 14, 479.
- (f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc., 1964, vol. 86, 5175
- (g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacology Library, Elsevier, New York, 1977.
- (h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- (i) R.A. Scherrer, ACS—American Chemical Society, Washington, D.C. 1984, Symposium Series 255, p. 225.

Annexe II

Substances de référence recommandées pour la méthode HPLC

No	Substance de référence	Log P _{ow}	pKa
1	2-butanone	0,3	
2	4-acétylpyridine	0,5	
3	aniline	0,9	
4	acétaniline	1,0	
5	alcool benzylique	1,1	
6	p-méthoxyphénol	1,3	pKa = 10,26
7	acide phénoxy-acétique	1,4	pKa = 3,12
8	phénol	1,5	pKa = 9,92
9	dinitrophénol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitrile	1,6	
11	phénylacétonitrile	1,6	
12	alcool 4-méthylbenzylique	1,6	
13	acétophénone	1,7	
14	2-nitrophénol	1,8	pKa = 7,17
15	acide 3-nitrobenzoïque	1,8	pKa = 3,47
16	4-chloraniline	1,8	pKa = 4,15
17	nitrobenzène	1,9	
18	alcool cinnamique	1,9	
19	acide benzoïque	1,9	pKa = 4,19
20	p-crésol	1,9	pKa = 10,17
21	acide cinnamique	2,1	pKa = 3,89 cis pKa = 4,44 trans
22	anisole	2,1	
23	méthylbenzoate	2,1	
24	benzène	2,1	
25	acide méthylbenzoïque	2,4	pKa = 4,27
26	chlorophénol	2,4	pKa = 9,1
27	trichloréthylène	2,4	
28	atrazine	2,6	
29	éthylbenzoate	2,6	
30	2,6-dichlorobenzonitrile	2,6	
31	acide chlorobenzoïque	2,7	pKa = 3,82
32	toluène	2,7	
33	naphtol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3 dichloroaniline	2,8	
35	chlorobenzène	2,8	
36	allyl-phényléther	2,9	
37	bromobenzène	3,0	
38	éthylbenzène	3,2	
39	benzophénone	3,2	
40	4-phénylphénone	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4-dichlorobenzène	3,4	
43	diphénylamine	3,4	pKa = 0,79
44	naphtalène	3,6	
45	phénylbenzoate	3,6	
46	isopropylbenzène	3,7	
47	2,4,6-trichlorophénol	3,7	pKa = 6
48	biphényl	4,0	
49	benzylbenzoate	4,0	
50	2,4-dinitro-6sec.butylphénol	4,1	
51	1,2,4-trichlorobenzène	4,2	
52	acide dodécanoïque	4,2	
53	diphényléther	4,2	
54	n-butylbenzène	4,5	
55	phénanthrène	4,5	
56	fluoranthène	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6-diphénylpyridine	4,9	
59	triphénylamine	5,7	
60	DDT	6,2	
Autre substance de référence dont le log P _{ow} est faible			
1	acide nicotinique	-0,07	

A.9. POINT D'ECLAIR

1. METHODE

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 dont les vapeurs peuvent être enflammées par des sources d'inflammation. Les méthodes d'essai énumérées dans le présent document ne sont valables que pour les intervalles de point d'éclair spécifiés dans les méthodes individuelles.

Il convient de tenir compte dans le choix de la méthode des réactions chimiques éventuelles entre la substance et le support de l'échantillon.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

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

Unités : °C

$$t = T - 273,15$$

(t est exprimé en °C et T en K)

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Il n'est pas nécessaire d'employer des substances de référence dans tous les cas où l'on étudie une nouvelle substance. Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

La substance est placée dans un récipient d'essai que l'on chauffe ou que l'on refroidit à la température d'essai, suivant le mode opératoire décrit dans la méthode d'essai individuel. Des essais d'inflammation doivent être effectués afin de s'assurer que la substance dégage ou non des vapeurs inflammables à la température d'essai.

1.5. CRITERES DE QUALITE

1.5.1. Répétabilité

La répétabilité 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 de données relatives à la substance (par exemple haute viscosité).

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Préparation

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

Par mesure de sécurité, il est conseillé d'utiliser pour les substances énergétiques ou toxiques, une méthode n'exigeant qu'un échantillon de petite taille (2 cm³ environ).

1.6.2. Conditions d'essai

L'appareil doit, dans la limite des règles de sécurité, être placé à l'abri des courants d'air.

1.6.3. Mode opératoire

1.6.3.1. Méthode de l'équilibre

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

1.6.3.2. Méthode du non-équilibre

Appareil d'Abel :

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

Appareil d'Abel-Pensky :

Voir normes EN 57, DIN 51755 partie 1 (pour des températures de 5 à 65 °C), DIN 51755 partie 2 (pour des températures inférieures à 5 °C), NF M07-036.

Appareil Tag :

Voir norme ASTM D 56.

Appareil de Pensky-Martens :

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

Observations :

Lorsque le point d'éclair, déterminé par une méthode basée sur le non-équilibre (point 1.6.3.2.), a une valeur de 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C ou 55 ± 2 °C, il importe de confirmer cette valeur 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, gommes et substances similaires) contenant des solvants, il ne faut utiliser que des appareils et des méthodes d'essai permettant de déterminer le point d'éclair des liquides visqueux.

Voir normes ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 partie 1.

2. DONNEES

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),
- la méthode utilisée ainsi que toute variante éventuelle,
- les résultats et toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

Aucune.

A.10. INFLAMMABILITE (SOLIDES)

1. METHODE

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.

Cet essai ne doit être appliqué 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.

La propagation de l'incandescence dans une poudre métallique peut être particulièrement dangereuse en raison des difficultés que présente l'extinction du feu. Les poudres métalliques sont considérées comme très inflammables si l'incandescence se propage dans tout l'échantillon en un temps déterminé.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Le temps de combustion est exprimé en secondes.

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

La substance est disposée de manière à former une bande ininterrompue ou une traînée de poudre d'environ 250 mm de longueur. Un essai préliminaire est effectué afin de déterminer si, par allumage à la flamme d'un brûleur à gaz, il se produit une propagation de la combustion avec ou sans flamme. Si la combustion se propage sur une distance de plus de 200 mm en un temps déterminé, un essai complet est effectué pour déterminer la vitesse de combustion.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Non établis.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Essai préliminaire

La substance est disposée en bande ininterrompue ou en traînée de poudre d'environ 250 mm de longueur par 20 mm de largeur et 10 mm de hauteur sur une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice. La flamme chaude d'un brûleur à gaz (diamètre minimum 5 mm) est appliquée à l'une des extrémités de la traînée de poudre jusqu'à ce que celle-ci s'enflamme, ou pendant un maximum de 2 minutes (5 minutes pour les poudres métalliques ou d'alliages métalliques). Noter si la combustion se propage le long de la traînée sur une distance de 200 mm pendant une durée d'essai de 4 minutes (40 minutes pour les poudres métalliques). Si la substance ne s'enflamme pas et ne propage pas la combustion, avec ou sans flamme, sur une distance de 200 mm pendant une durée d'essai de 4 minutes (ou 40 minutes), la substance n'est pas considérée comme très inflammable, et il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Si la combustion de la substance se propage sur une distance de 200 mm sur la traînée de poudre en moins de 4 minutes (ou de 40 minutes pour les poudres métalliques), le mode opératoire décrit ci-dessous (au point 1.6.2 et suivants) doit être suivi.

1.6.2. Essai de vitesse de combustion.

1.6.2.1. Préparation

Les substances poudreuses ou granuleuses sont versées en vrac dans un moule de 250 mm de longueur et de section transversale triangulaire dont la hauteur et la largeur intérieure sont respectivement de 10 et 20 millimètres. Disposer de part et d'autre du moule, dans le sens de la longueur, deux plaques métalliques destinées à jouer le rôle de supports latéraux. Ces plaques dépassent de 2 mm le bord supérieur de la section triangulaire transversale (voir figure). Ensuite, laisser tomber trois fois le moule d'une hauteur de 2 cm sur une surface dure. Rajouter de la substance s'il y a lieu. Enlever ensuite les plaques latérales et racler le trop-plein. Placer une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice sur le moule, retourner l'ensemble et démouler.

Les substances pâteuses sont étalées sur une plaque non combustible, non poreuse et peu thermoconductrice sous la forme d'un cordon de 250 mm de longueur et d'environ 1 cm² de section transversale.

1.6.2.2. 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.

1.6.2.3. Mode opératoire

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

La vitesse de l'air doit suffire à empêcher la fumée de se répandre dans le laboratoire et ne doit pas être modifiée au cours de l'essai. Le flux d'air doit former un écran qui entoure l'appareil.

L'une des extrémités du tas est enflammée à l'aide de la flamme chaude d'un brûleur à gaz (diamètre minimal 5 mm). Lorsque le tas a brûlé sur une distance de 80 mm, mesurer la vitesse de combustion sur les 100 mm suivants.

Répéter l'essai six fois, en utilisant chaque fois une plaque propre et froide, à moins d'observer un résultat positif avant.

2. DONNEES

Le temps de combustion observé lors de l'essai préliminaire (1.6.1) et le temps de combustion le plus court observé au cours de l'essai (1.6.2.3) sont pertinents pour l'évaluation.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),
- une description de la substance à essayer, son état physique, y compris son taux d'humidité,
- les résultats des essais préliminaires et des essais de vitesse de combustion, si ces derniers ont été effectués,
- toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les substances poudreuses, granuleuses ou pâteuses doivent être considérées comme très inflammables lorsque le temps de combustion observé au cours de l'un des essais effectués conformément au mode opératoire décrit au point 1.6.2 est inférieur à 45 secondes. Les poudres métalliques ou d'alliages métalliques doivent être considérées comme très inflammables lorsqu'elles peuvent être enflammées et que la flamme ou la zone de réaction s'étend à tout l'échantillon en 10 minutes ou moins.

4. REFERENCES

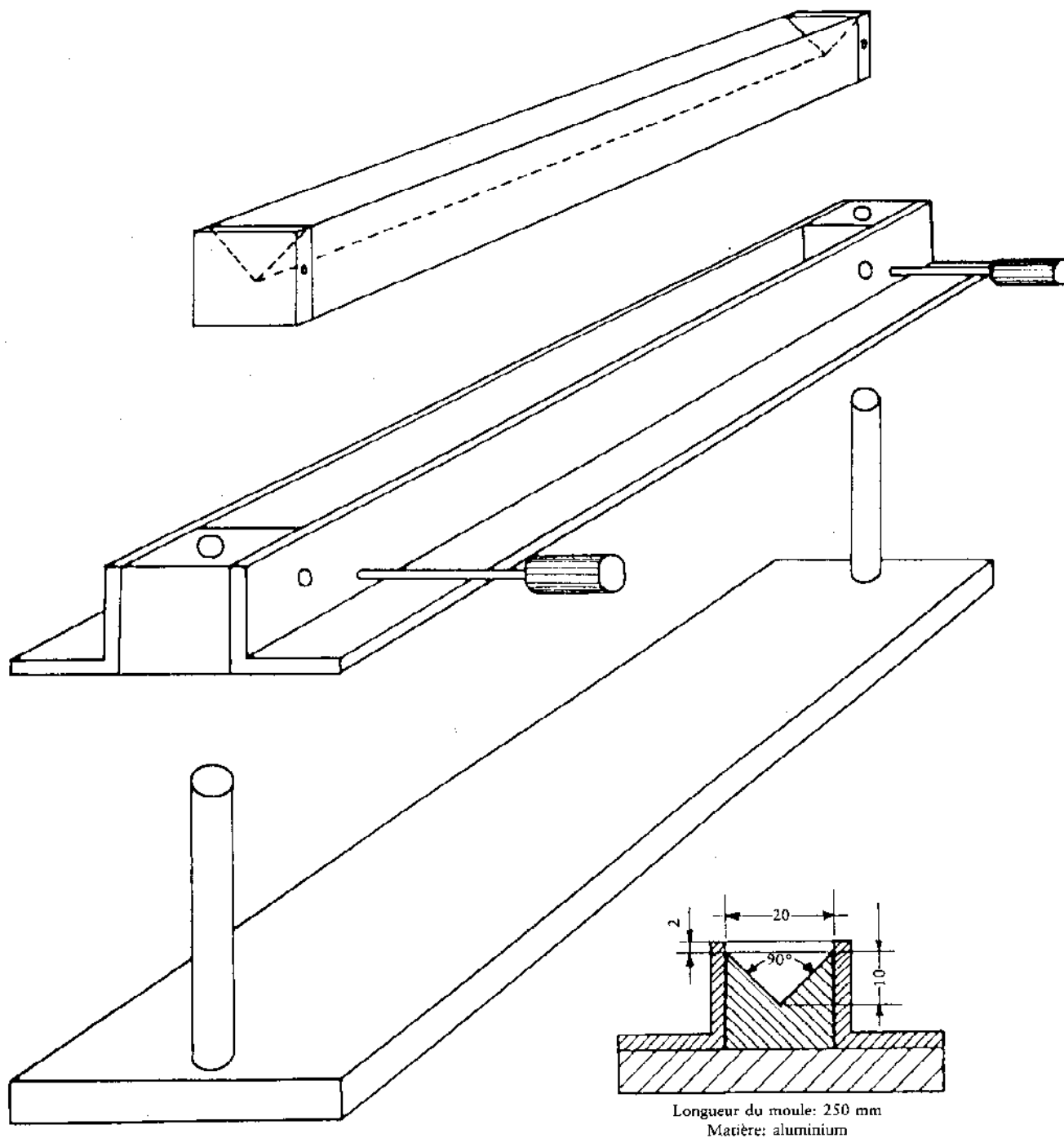
(1) NF T 20-042 (Septembre 85). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité des solides.

Annexe

Figure

Moule et accessoires nécessaires à la confection des tas

(toutes les dimensions sont exprimées en millimètres)



A.11. INFLAMMABILITE (GAZ)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

La présente méthode permet de déterminer si des gaz mélangés à l'air à température ambiante (20 °C environ) et à la pression atmosphérique sont inflammables et, s'ils le sont, dans quel intervalle de concentration. Des mélanges contenant des concentrations croissantes du gaz à tester dans de l'air sont exposés à une étincelle électrique et on observe si l'inflammation se produit.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

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 l'inflammation ne se propage pas.

1.3. SUBSTANCE DE REFERENCE

Non spécifiée.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

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

1.5. CRITERES DE QUALITE

Non fixés.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Appareil

Le récipient d'essai est un cylindre en verre d'un diamètre intérieur de 50 mm au moins et d'une hauteur de 300 mm au moins, disposé verticalement. Les électrodes d'inflammation sont distantes l'une de l'autre de 3 à 5 mm et placées à 60 mm 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). Un modèle d'appareil approprié est décrit dans la référence (2).

1.6.2. Conditions d'essai

L'essai doit avoir lieu à température ambiante (20 °C environ).

1.6.3. Mode opératoire

Remplir le cylindre en verre d'un mélange air-gaz de concentration connue à l'aide de pompes doseuses. Faire jaillir une étincelle au travers de ce mélange et observer si une flamme se détache de la source d'inflammation et se propage de manière indépendante. La concentration du gaz est modifiée par étapes de 1 % en volume jusqu'à ce que l'inflammation décrite ci-dessus se produise.

Si la structure chimique du gaz laisse supposer qu'il doit être ininflammable et s'il est possible de calculer la composition du mélange stoechiométrique avec l'air, ne soumettre à essai, par étapes de 1 %, que des mélanges dans une gamme comprise entre 10 % de moins que la composition stoechiométrique et 10 % de plus.

2. DONNEES

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

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés);
- une description, incluant les dimensions, de l'appareil utilisé;
- la température à laquelle l'essai a été réalisé;
- les concentrations d'essai ainsi que les résultats obtenus;
- le résultat de l'essai : gaz ininflammable ou très inflammable;
- lorsque l'on conclut à l'ininflammabilité, il convient de préciser l'intervalle de concentration sur lequel a porté l'essai, par étapes de 1 %.
- toute information et observation pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

(1) NF T 20-041 (Septembre 85). Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité des gaz.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. « Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung van Explosionsgrenzen ». Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 2, 126- 127.

A.12. INFLAMMABILITE (AU CONTACT DE L'EAU)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

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

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. DEFINITIONS ET UNITES

Très inflammables : substances qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent une quantité dangereuse de gaz très inflammables à raison d'un débit minimal de 1 litre/kg par heure.

1.3. PRINCIPE DE LA METHODE

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. Si on sait que la substance ne réagit pas violemment avec l'eau, procéder à la phase 4 (voir 1.3.4).

1.3.1. Phase 1

Placer la substance à tester 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 à tester 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 à tester en tas sur une hauteur de 2 cm et un diamètre de 3 cm environ. 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 par heure à un moment donné.

1.4. SUBSTANCE DE REFERENCE

Non spécifiée.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Non indiqués.

1.6. DESCRIPTION DES METHODES

1.6.1. Phase 1

1.6.1.1. Conditions de l'essai

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.1.2. Mode opératoire

Placer une petite quantité (approximativement 2 mm de diamètre) de la substance à tester 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. Appareil

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

1.6.2.2. Conditions de l'essai

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.2.3. Mode opératoire

Placer une petite quantité (approximativement 2 mm de diamètre) de la substance à tester au centre du papier-filtre. 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.

1.6.3. Phase 3

1.6.3.1. Conditions de l'essai

L'essai est effectué à température ambiante (20 °C, environ).

1.6.3.2. Mode opératoire

Mettre la substance à tester en tas sur une hauteur de 2 cm et un diamètre de 3 cm environ en aménageant au sommet un petit cratère. Ajouter quelques gouttes d'eau dans le creux. 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.

1.6.4. Phase 4

1.6.4.1. Appareil

L'appareil est monté comme indiqué sur la figure.

1.6.4.2. Conditions de l'essai

S'assurer que le récipient contenant la substance à tester 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 la substance en poudre avant de procéder à l'essai, afin de réduire la dimension des particules pendant le stockage et la manutention; sinon, la substance est utilisée telle qu'elle est reçue. L'essai doit être réalisé à température ambiante (20 °C environ) et à pression atmosphérique.

1.6.4.3. Mode opératoire

Verser de 10 à 20 ml d'eau dans l'entonnoir à robinet de l'appareillage et placer 10 g de substance dans la fiole conique. Le volume de gaz qui se dégage peut être mesuré par tout moyen approprié. Ouvrir le robinet de l'entonnoir pour laisser pénétrer l'eau dans la fiole conique et déclencher un chronomètre. Le dégagement gazeux est mesuré toutes les heures pendant sept heures. Si, pendant cette période, le dégagement gazeux devient irrégulier, ou si, à la fin de cette période, son débit augmente, il convient de poursuivre les mesures pendant cinq jours. Si, à un moment quelconque des mesures, le débit du dégagement gazeux excède 1 litre/kg par heure, l'essai peut être interrompu. L'essai doit être réalisé en triple.

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

2. DONNEES

La substance est considérée comme dangereuse si :

- une inflammation spontanée intervient lors d'une phase quelconque du déroulement de l'essai,
- un gaz inflammable se dégage à un débit supérieur à 1 litre/kg de substance par heure.

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés);
- une description détaillée de toute préparation préalable de la substance à essayer;
- les résultats de l'essai (phases 1, 2, 3 et 4);
- l'identité chimique du gaz qui se dégage;
- le débit du dégagement gazeux, si la phase 4 (1.6.4) est effectuée;
- le résultat de l'essai : gaz ininflammable ou très inflammable;
- toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

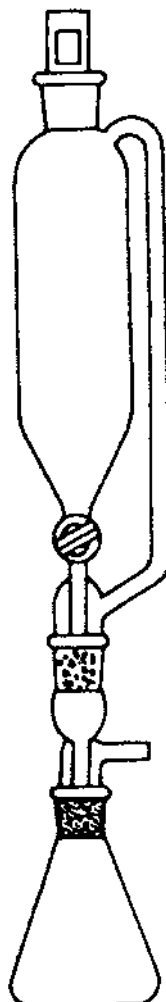
(1) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses. Epreuves et critères, 1990, Nations unies, New York.

(2) NF T 20-040 (septembre 1985), Produits chimiques à usage industriel. Détermination de l'inflammabilité des gaz engendrés par hydrolyse des produits solides et liquides.

Annexe

Figure

Appareillage



A.13. PROPRIETES PYROPHORIQUES DES SOLIDES ET DES LIQUIDES

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai est applicable aux substances solides et liquides, qui, en petite quantité, s'enflamment spontanément, peu de temps après être entrées en contact avec l'air à température ambiante (20 °C environ).

Les substances dont l'inflammation spontanée n'intervient qu'après une exposition de plusieurs heures ou de plusieurs jours à température ambiante, ou à des températures élevées, ne sont pas couvertes par cette méthode d'essai.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Les substances sont considérées comme ayant des propriétés pyrophores si elles s'enflamment ou causent la carbonisation dans les conditions décrites au point 1.6.

L'auto-inflammabilité des liquides peut également exiger d'être évaluée selon la méthode A.15 (température d'inflammation spontanée des liquides et des gaz).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Non spécifiées.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

La substance, solide ou liquide, est ajoutée à un porteur inerte et mise en contact avec l'air à température ambiante pendant une période de cinq minutes. Si les substances liquides ne s'enflamment pas, elles sont absorbées sur un papier-filtre qui est exposé à l'air, à température ambiante (20 °C environ), pendant cinq minutes. Si la substance, solide ou liquide, enflamme ou carbonise un papier-filtre, elle est considérée comme pyrophorique.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Répétabilité : en raison de l'importance que revêt l'aspect « sécurité », un seul résultat positif est suffisant pour conclure que la substance est très inflammable.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Appareillage

Remplir une capsule de porcelaine de 10 cm de diamètre environ de terre d'infusoires, sur une épaisseur de 5 mm environ, à température ambiante (20 °C environ).

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.

Les essais concernant les liquides qui ne s'enflamment pas au contact de l'air lorsqu'ils sont en contact avec un porteur inerte seront effectués avec un papier-filtre sec.

1.6.2. Réalisation de l'essai

a) Solides pulvérulents

Verser 1 ou 2 cm³ de substance pulvérulente à tester, d'une hauteur d'environ 1 m sur une surface non combustible et observer si la substance s'enflamme pendant la chute ou pendant les cinq premières minutes de tassement.

L'essai est répété six fois, à moins qu'une inflammation ne survienne.

b) Liquides

Verser environ 5 cm³ de liquide à essayer dans une capsule de porcelaine préparée et observer si la substance s'enflamme dans les cinq minutes.

S'il ne survient pas d'inflammation au cours de six essais, effectuer l'essai suivant :

Déposer à l'aide d'une seringue 0,5 ml de l'échantillon à essayer sur un papier-filtre à cet usage et observer si le papier-filtre s'enflamme ou se carbonise dans les cinq minutes qui suivent le dépôt du liquide. L'essai est effectué trois fois, à moins qu'une inflammation ou une carbonisation ne survienne.

2. DONNEES

2.1. TRAITEMENT DES RESULTATS

L'essai peut être interrompu dès que l'un des essais donne un résultat positif

2.2. EVALUATION

Si la substance s'enflamme dans les cinq minutes après avoir été ajoutée à un porteur inerte et exposée à l'air, ou si un liquide carbonise ou enflamme un papier-filtre dans les cinq minutes après avoir été déposé sur ce dernier et exposé à l'air, il est considéré comme pyrophore.

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés);
- les résultats de l'essai;
- toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

(1) NF T 20-039 (Septembre 85), Produits chimiques à usage industriel — Détermination de l'inflammabilité spontanée des solides et liquides.

(2) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses — Epreuves et critères, 1990, Nations unies, New York.

A.14. DANGER D'EXPLOSION

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Cette méthode permet de déterminer si une substance solide ou pâteuse présente 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), et si une substance liquide présente un danger d'explosion lorsqu'elle est soumise à l'effet d'une flamme ou d'un choc.

La méthode comprend trois parties :

- a) un essai de sensibilité thermique (1);
- b) un essai de sensibilité mécanique (choc) (1);
- c) un essai de sensibilité mécanique (friction) (1).

La méthode fournit des données permettant d'évaluer la probabilité d'amorcer une explosion par certaines stimulations ordinaires. Elle n'a pas pour objet d'affirmer qu'une substance n'est pas susceptible d'exploser dans certaines conditions.

La méthode est apte à déterminer si une substance présentera un danger d'explosion (sensibilité thermique et mécanique) dans les conditions particulières définies par l'arrêté. Elle repose sur un certain nombre de types d'appareils qui sont largement utilisés sur le plan international (1) et qui donnent en règle générale des résultats probants. Il est cependant admis qu'elle n'a pas une valeur définitive. D'autres appareils que ceux qui sont mentionnés peuvent être utilisés, à condition qu'ils soient reconnus à l'échelle internationale et que les résultats puissent être mis en corrélation avec les résultats obtenus avec les appareils spécifiés.

Il n'est pas nécessaire d'effectuer les essais lorsque les informations disponibles, d'ordre thermodynamique (par exemple : chaleur de formation, chaleur de décomposition) ou structural (absence de certains groupes réactifs (2) dans la formule développée), montrent que la substance n'est, sans aucun doute, pas susceptible de se décomposer rapidement en libérant des gaz ou de la chaleur (à savoir, que ce matériau ne présente aucun risque d'explosion). Il est inutile de réaliser un essai de sensibilité mécanique à la friction pour les liquides.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Substances explosibles :

Substances qui sont susceptibles d'exploser sous l'effet d'une flamme, ou qui sont sensibles au choc ou à la friction dans l'appareil spécifié (ou dont la sensibilité mécanique est supérieure à celle du 1,3-dinitrobenzène dans un autre appareil).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

1,3-dinitrobenzène, produit technique cristallisé, tamisé (qui passe au travers d'une maille de 0,5 mm) pour la méthode d'essai par friction et par choc.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX, hexogène, cyclonite—CAS 121- 82-4), recristallisé à partir d'une solution aqueuse de cyclohexanone, tamisé mouillé au travers d'une maille de 250 µm et retenu par une maille de 150 µm puis séché à 103 ± 2 °C (pendant 4 heures) pour la seconde série d'essais par friction et par choc.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

Des essais préliminaires sont nécessaires pour établir les conditions de sécurité devant présider à l'exécution des trois essais de sensibilité.

1.4.1. Essais de sécurité de manipulation (3)

Pour des raisons de sécurité, avant d'effectuer les essais proprement dits, des échantillons très réduits (10 mg environ) de substance sont soumis à échauffement sans confinement dans la flamme d'un brûleur à gaz, à un choc dans toute forme appropriée d'appareil, et à friction en utilisant un maillet et une enclume ou tout autre type de dispositif à friction. Ces essais ont pour objectif de déterminer si la substance est sensible et explosible au point de devoir s'entourer de précautions particulières pour réaliser les essais de sensibilité prescrits, notamment les essais de sensibilité thermique, afin d'éviter tout dommage corporel pour l'expérimentateur.

1.4.2. Sensibilité thermique

Cette méthode consiste à chauffer la substance dans un tube d'acier, fermé par des plaques à orifice dont le trou peut avoir différents diamètres, pour déterminer si la substance ou la préparation est susceptible d'exploser dans des conditions de température très élevée et de confinement défini.

1.4.3. Sensibilité mécanique (choc)

Cette méthode consiste à soumettre la substance au choc d'une masse spécifiée tombant d'une hauteur définie.

1.4.4. Sensibilité mécanique (friction)

La méthode consiste à soumettre des substances solides ou pâteuses à une friction entre des surfaces standard dans des conditions spécifiées de charge et de mouvement relatif.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Non indiqués.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Sensibilité thermique (effet d'une flamme)

1.6.1.1. Appareil

L'appareil consiste en un tube d'acier non réutilisable et de son système de fermeture réutilisable (figure 1), installé dans un dispositif de chauffage et de protection. Chaque tube, d'un diamètre interne de 24 mm, d'une longueur de 75 mm et d'une épaisseur de paroi de 0,5 mm, est réalisé par un processus d'emboutissage profond à partir d'une tôle (voir appendice). Les tubes sont pourvus d'une bride de fermeture à leur extrémité ouverte afin de pouvoir les fermer par une plaque à orifice. Il s'agit d'une plaque solidement assujettie au tube par un joint fileté en deux parties (écrou et écrou borgne), résistante à la pression et munie d'un orifice central. L'écrou et l'écrou borgne sont en acier au chrome-manganèse (voir annexe) ne produisant aucune étincelle jusqu'à 800 °C. Les plaques ont une épaisseur de 6 mm et sont fabriquées avec un acier résistant à la chaleur (voir annexe). L'expérimentateur dispose d'une série de plaques dont l'orifice présente différents diamètres.

1.6.1.2. Conditions de l'essai

L'essai est normalement réalisé avec la substance telle qu'elle est reçue; toutefois, dans certains cas, par exemple si elle est comprimée, coulée ou condensée d'une manière quelconque, il peut être nécessaire de la désagréger avant de procéder à l'essai.

Pour les solides, la masse de matériel à utiliser pour chaque essai est déterminée par une opération préliminaire à deux étapes. Placer un volume de substance de 9 cm³ dans un tube taré, puis tasser en appliquant une force de 80 N sur toute la surface de la section du tube. D'autres méthodes de remplissage doivent parfois être utilisées pour des raisons de sécurité ou lorsque l'état physique de l'échantillon peut être modifié par la compression, par exemple, si la substance est très sensible à la friction, il ne faut pas tasser. Si le matériel est compressible, en rajouter et tasser jusqu'à ce que le tube soit rempli jusqu'à 55 mm du bord. Déterminer la masse totale utilisée pour remplir le tube jusqu'à ce niveau, puis ajouter de la substance encore deux fois, en tassant à chaque fois avec une force de 80 N. Ensuite, rajouter du matériel et tasser, ou enlever, de manière à ce que le tube soit rempli jusqu'à 15 mm du bord. Effectuer une seconde opération préliminaire en commençant avec une quantité tassée correspondant au tiers de la masse totale déterminée lors de l'opération précédente. Ajouter deux fois de la substance en tassant avec une force de 80 N et ajuster le niveau à 15 mm du bord du tube en ajoutant du matériel ou en enlevant. La quantité de produit solide déterminée lors de cette seconde opération est utilisée pour chaque essai; le remplissage est effectué en trois fois avec des quantités égales de substance comprimées afin que leur volume soit de 9 cm³, quelle que soit la force nécessaire pour y parvenir. (Cette opération peut être facilitée par l'emploi d'anneaux d'espacement.)

Les liquides et les gels sont versés dans le tube jusqu'à une hauteur de 60 mm, en prenant soin d'éviter la formation de bulles d'air avec les gels. L'écrou borgne est glissé sur le tube par le bas, la plaque à orifice appropriée est insérée et l'écrou est serré après qu'a été appliqué un lubrifiant à base de bisulfite de molybdène. Il est important de vérifier qu'aucune substance n'est emprisonnée entre la bride et la plaque, ni dans les filetages.

Le chauffage est assuré par du propane venant d'une bouteille industrielle, équipée d'un régulateur de pression (60 à 70 mbar), grâce à un débitmètre, et distribué régulièrement (ce que l'on vérifie en observant les flammes des brûleurs) par un collecteur à quatre brûleurs. Les brûleurs sont situés autour de la chambre d'essai, comme indiqué à la figure 1. Les quatre brûleurs consomment ensemble 3,2 litres de propane par minute, environ. Il est possible d'utiliser d'autres gaz de chauffage et d'autres brûleurs, mais la vitesse de chauffage doit correspondre à celle qui est spécifiée à la figure 3. Pour tous les appareils, la vitesse de chauffage doit être vérifiée régulièrement en utilisant des tubes remplis de phtalate de dibutyle, comme indiqué à la figure 3.

1.6.1.3. Déroulement des essais

Chaque essai est poursuivi jusqu'à ce que le tube se soit fragmenté ou que le tube ait été chauffé pendant cinq minutes. Un essai aboutissant à la fragmentation du tube en trois parties, ou plus, qui peuvent parfois être reliées l'une à l'autre par d'étroites bandes de métal, comme l'illustre la figure 2, est considéré comme produisant une explosion. Un essai aboutissant à un plus petit nombre de fragments ou à une absence de fragmentation, est considéré comme ne produisant pas d'explosion.

Une série de trois essais est d'abord effectuée avec une plaque dont l'orifice a un diamètre de 6,0 mm et, si aucune explosion ne se produit, une seconde série de trois essais est réalisée avec une plaque dont l'orifice a un diamètre de 2,0 mm. S'il se produit une explosion au cours de l'une des séries d'essais, aucun essai supplémentaire n'est requis.

1.6.1.4. Evaluation

Le résultat de l'essai est considéré comme positif s'il se produit une explosion au cours de l'une des séries d'essais mentionnées ci-avant.

1.6.2. Sensibilité mécanique (choc)

1.6.2.1. Appareil (figure 4)

Le mouton de choc classique comprend essentiellement : un bloc de fonte avec une embase, une enclume, une colonne, des guides, des masses tombantes, un mécanisme de libération et un support pour l'échantillon. L'enclume d'acier (100 mm de diamètre x 70 mm de hauteur) est vissée sur un bloc d'acier (230 mm de longueur x 250 mm de largeur x 200 mm de hauteur) avec une embase coulée (450 mm de longueur x 450 mm de largeur x 60 mm de hauteur). Une colonne, qui consiste en un tube d'acier étiré sans soudure, est fixée dans un support vissé au dos du bloc d'acier. Quatre vis ancrent l'appareil dans un bloc de béton (60 x 60 x 60 cm) de telle sorte que les rails soient absolument verticaux et que la chute de la masse tombante ne soit pas entravée. L'expérimentateur dispose de masses de 5 et 10 kg, en acier trempé et dont la surface d'impact, d'un diamètre minimal de 25 mm, est en acier traité HRC 60 à 63.

L'échantillon à essayer est enfoncé dans une matrice de choc constituée de deux cylindres coaxiaux en acier trempé, placés l'un au-dessus de l'autre dans un cylindre d'acier creux faisant office de bague de guidage. Les cylindres d'acier trempé doivent avoir un diamètre de 10 (-0,003, -0,005) mm et une hauteur de 10 mm, des surfaces polies, des arêtes arrondies (rayon de courbure 0,5 mm) et une dureté de HRC 58 à 65. Le cylindre creux doit avoir un diamètre extérieur de 16 mm, un alésage de 10 (+0,005, +0,010) mm et une hauteur de 13 mm. La matrice de choc est placée sur une enclume intermédiaire (26 mm de diamètre et 26 mm de hauteur) en acier, centrée par une bague munie de perforations permettant aux vapeurs de s'échapper.

1.6.2.2. Conditions de l'essai

L'échantillon doit avoir un volume de 40 mm³, ou un volume compatible avec l'appareil utilisé. Les substances solides doivent être essayées à l'état sec et préparées comme suit :

a) les substances pulvérulentes sont tamisées (maille de 0,5 mm); la fraction séparée par tamisage est entièrement utilisée pour l'essai;

b) les substances comprimées, coulées ou condensées sont désagrégées et tamisées; la fraction de 0,5 à 1 mm de diamètre séparée par tamisage est utilisée pour l'essai et doit être représentative de la substance originale.

Les substances sous forme de pâte doivent être essayées à l'état sec si c'est possible, ou, en tout cas, après avoir enlevé la plus grande quantité possible de diluant. Pour ce qui est des substances liquides, l'essai est réalisé avec un intervalle de 1 mm entre le cylindre d'acier du haut et celui du bas.

1.6.2.3. Déroulement des essais

On effectue une série de six essais en faisant tomber une masse de 10 kg d'une hauteur de 0,40 m (40 J). S'il se produit une explosion au cours des six essais effectués à 40 J, une autre série de six essais doit être effectuée en faisant tomber une masse de 5 kg d'une hauteur de 0,15 m (7,5 J). Dans d'autres appareils, l'échantillon est comparé avec la substance de référence choisie selon la procédure établie (technique du « up-and-down », etc.).

1.6.2.4. Evaluation

Le résultat de l'essai est considéré comme positif si une explosion (l'inflammation ou un bruit intense équivalent à une explosion) se produit au moins une fois au cours des six essais réalisés avec l'appareil de choc indiqué ou si l'échantillon est plus sensible que le 1,3-dinitrobenzène ou le RDX lors d'un autre essai par choc.

1.6.3. Sensibilité mécanique (friction)

1.6.3.1. Appareil (figure 5)

L'appareil consiste en une plaque de base en fonte sur laquelle est monté le dispositif de friction proprement dit comprenant un crayon fixe en porcelaine et une plaquette mobile en porcelaine. La plaquette est fixée dans un coulisseau se déplaçant entre deux rails. Le coulisseau est relié par une barre d'entraînement et un engrenage de transmission excentrique à un moteur électrique, de telle sorte que la plaquette se déplace une fois seulement sur une distance de 10 mm, en arrière et en avant sous le crayon. Le crayon peut être chargé, par exemple, à 120 ou 360 newtons.

Les plaquettes de porcelaine plates sont en porcelaine blanche technique (rugosité de 9 à 32 µm) et ont les dimensions suivantes : 25 mm de longueur, 25 mm de largeur et 5 mm de hauteur. Le crayon cylindrique qui est également en porcelaine blanche technique (longueur 15 mm, diamètre 10 mm), présente des extrémités sphériques rugueuses dont le rayon de courbure est de 10 mm.

1.6.3.2. Conditions de l'essai

L'échantillon doit avoir un volume de 10 mm³, ou un volume compatible avec l'appareil utilisé.

Les substances solides sont essayées à l'état sec et préparées comme suit :

a) les substances pulvérulentes sont tamisées (maille de 0,5 mm); la fraction séparée par tamisage est entièrement utilisée pour l'essai;

b) les substances comprimées, coulées ou condensées sont désagrégées et tamisées; la fraction tamisée d'un diamètre inférieur à 0,5 mm est utilisée pour l'essai.

Les substances sous forme de pâte doivent être essayées à l'état sec si possible. Si la substance ne peut pas être préparée à l'état sec, la pâte (après avoir enlevé la plus grande quantité possible de diluent) est essayée sous la forme d'un film de 0,5 mm d'épaisseur, 2 mm de largeur et 10 mm de longueur préparé à l'aide d'un gabarit.

1.6.3.3. *Déroulement des essais*

Placer le crayon de 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 la plaquette de porcelaine doivent être transversales par rapport à la direction du mouvement. Veiller à ce que le crayon repose sur l'échantillon, à ce que la quantité de substance essayée soit suffisante et à ce que la plaquette se déplace correctement sous le crayon. Les substances pâteuses seront appliquées sur le plateau à l'aide d'un gabarit de 0,5 mm d'épaisseur avec une rainure de 2 x 10 mm. La plaquette de porcelaine accomplit sous le crayon un mouvement de va-et-vient sur une distance de 10 mm dans chaque direction en 0,44 secondes. N'utiliser chaque partie de la surface de la plaquette et du crayon que pour un seul essai; les deux extrémités de chaque crayon serviront pour deux essais et les deux surfaces de la plaquette pour trois essais.

Une série de six essais est effectuée avec une charge de 360 N. Si un résultat positif survient au cours de ces six essais, il convient d'effectuer une autre série de six essais avec une charge de 120 N. Dans d'autres appareils, l'échantillon est comparé avec la substance de référence choisie en suivant un mode opératoire établi (technique « up-and-down », etc).

1.6.3.4. *Evaluation*

Le résultat de l'essai est considéré comme positif s'il se produit au moins une explosion (un crépitement, un bruit intense ou une inflammation sont équivalents à une explosion) au cours de l'un des essais réalisés avec l'appareil de friction indiqué ou s'il satisfait aux critères équivalents pour un autre essai de friction.

2. DONNEES

En principe, une substance est considérée comme présentant un risque d'explosion dans le sens de l'arrêté dès qu'un résultat est positif lors des essais de sensibilité thermique, au choc ou à la friction.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- l'identité, la composition, la pureté, le contenu en humidité, etc. de la substance soumise à essai;
- la forme physique de l'échantillon; préciser s'il a été désagrégé, cassé ou tamisé;
- les observations relevées au cours des essais de sensibilité thermique (par exemple masse de l'échantillon, nombre de fragments etc.);
- les observations relevées au cours des essais de sensibilité mécanique (par exemple formation d'une quantité considérable de fumée ou décomposition complète sans bruit intense, flammes, étincelles, crépitation etc.);
- les résultats de chaque type d'essai;
- si un autre appareil a été utilisé, fournir une justification scientifique ainsi que la preuve de la corrélation entre les résultats obtenus avec l'appareil spécifié et les résultats obtenus avec l'appareil utilisé;
- tout commentaire utile, se référant notamment aux essais pratiqués avec des produits similaires, susceptible d'être pertinent pour une interprétation correcte des résultats;
- toutes observations supplémentaires pertinentes pour l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRETATION ET EVALUATION DES RESULTATS

Le rapport d'essai doit mentionner tous les 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. À moins de pouvoir expliquer un résultat anormal, celui-ci doit être accepté tel quel et utilisé pour classer la substance en conséquence.

4. REFERENCES

- (1) Recommandations relatives au transport des marchandises dangereuses, Epreuves et critères, 1990, Nations unies, New York
- (2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th édition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
- (3) Koenen, H., Ide, K.H. und Swart, K.H. Explosive Stoffe, 1961, vol.3, 6-13 and 30-42.
- (4) NFT 20-038 (septembre 85). Produits chimiques à usage industriel — Détermination du danger d'explosion.

Annexe

Exemple de spécification de matériel pour les essais de sensibilité thermique (voir norme DIN 1623)

- (1) Tube : Spécification de matériel N° 1.0336.505 g
- (2) Plaque à orifice : Spécification de matériel N° 1.4873
- (3) Ecrou et écrou borgne : Spécification de matériel N° 1.3817

Figure 1
Appareil d'essai de sensibilité thermique

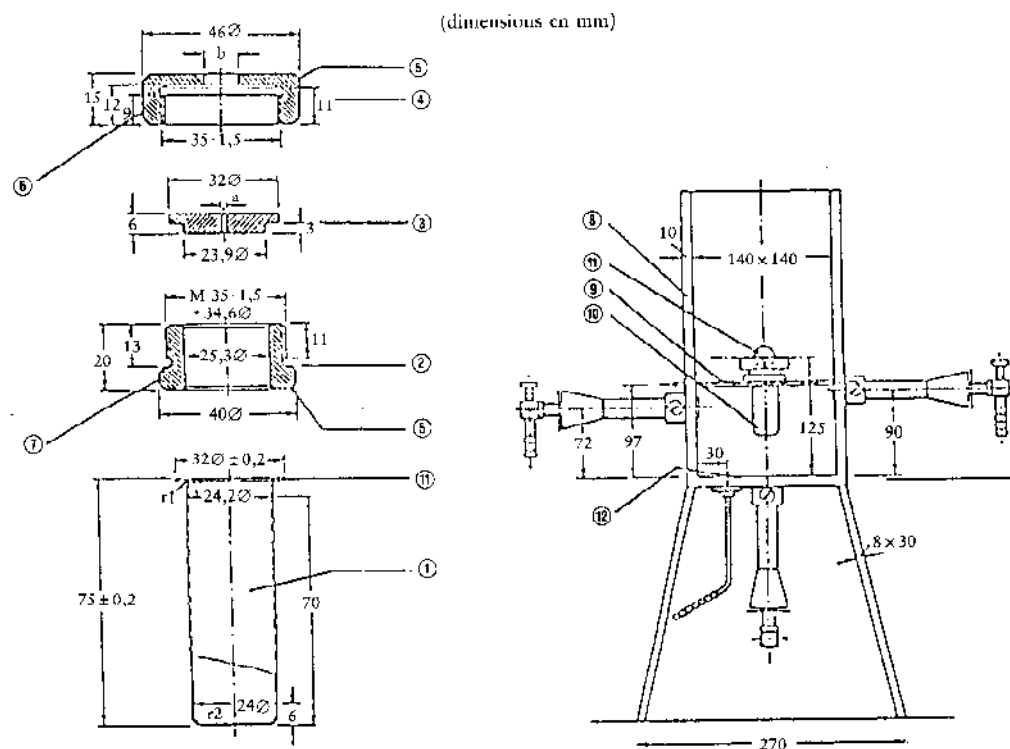


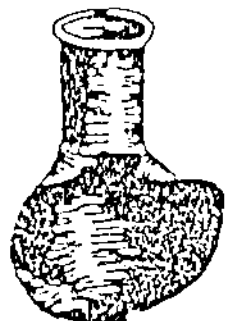
Fig.1a Tube d'acier et accessoires

- (1) tube
- (1a) bride extérieure
- (2) collier fileté;
filetage à faible friction
- (3) plaque à orifice a =
2,0 ou 6,0 mm de diamètre
- (4) écrou b = 10 mm de diamètre
- (5) chanfrein
- (6) 2 pans pour clé de 41

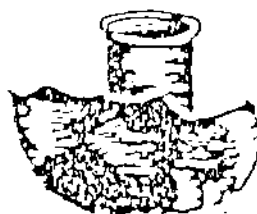
Fig.1b Dispositifs de chauffage et de protection

- (7) 2 pans pour clé de 36
- (8) enceinte résistante aux
éclats
- (9) 2 barres de support pour le tube
- (10) tube assemblé
- (11) position du brûleur arrière;
les autres brûleurs sont (5)
visibles
- (12) veilleuse

Figure 2
Essai de sensibilité thermique
Exemples de fragmentation



Pas d'explosion



Pas d'explosion



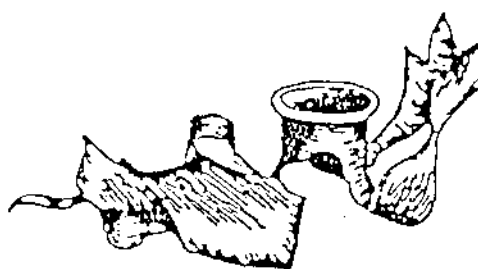
Explosion



Explosion



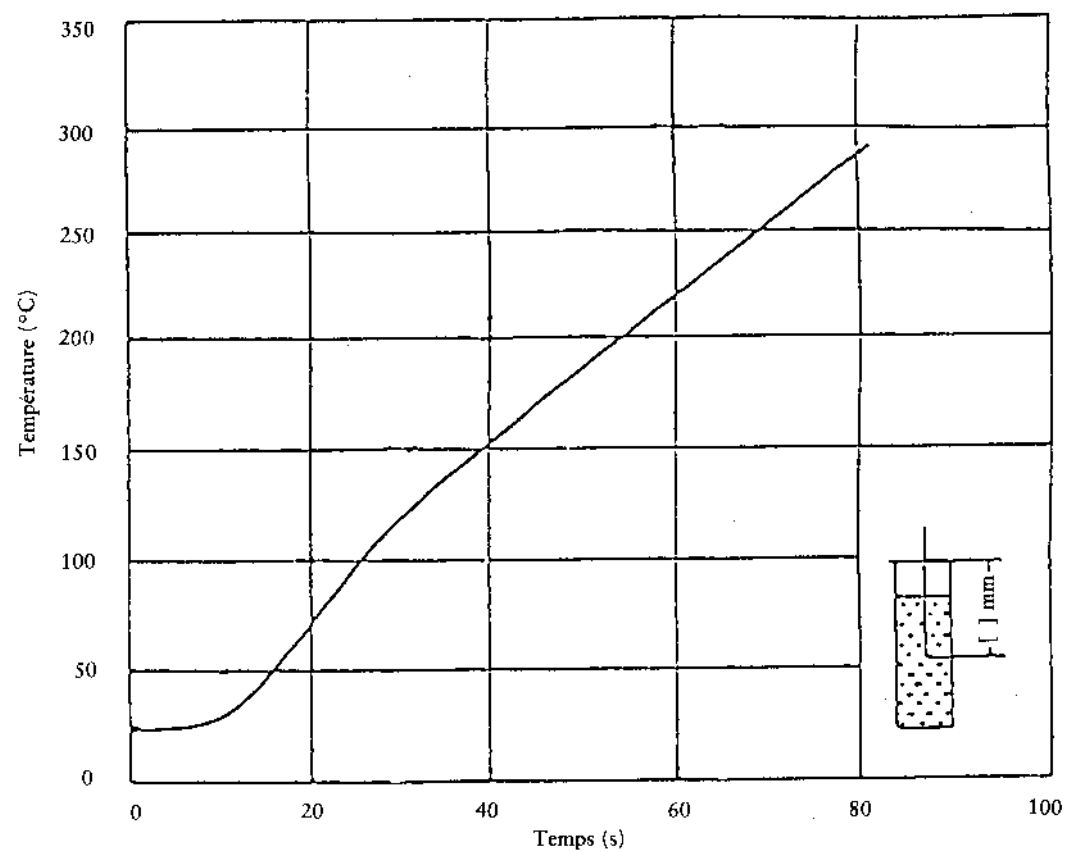
Explosion



Explosion

Figure 3

Étalonnage de la vitesse d'échauffement pour essai de sensibilité thermique TEMPS (s)



Courbe de température en fonction du temps obtenue en chauffant du phtalate de dibutyle (27 cm^3) dans un tube fermé (plaque à orifice de 1,5 mm) au moyen d'un débit de propane de 3,2 litres/minute. La température est mesurée à l'aide d'un thermocouple chromel/alumel gainé d'acier inoxydable de 1 mm de diamètre, placé en position centrale, 43 mm sous le bord du tube. Entre 135 °C et 285 °C, la vitesse d'échauffement doit se situer entre 185 et 215 K/minute.

Figure 4
Appareil d'essai de sensibilité au choc
(dimensions en mm)

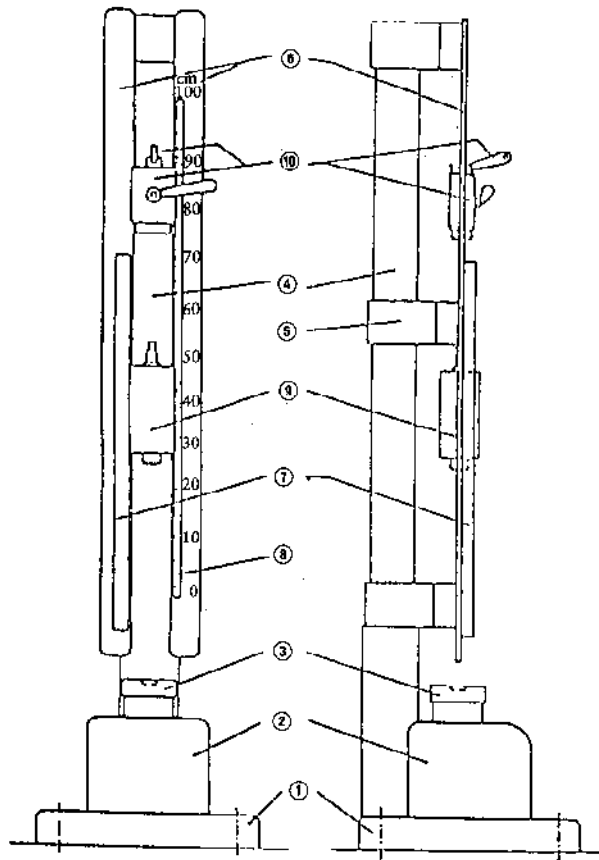


Fig. 4a Appareil à mouton, vue générale de face et latérale

- (1) embase 450 × 450 × 60
- (2) bloc d'acier 230 × 250 × 200
- (3) enclume 100 (diamètre) × 70
- (4) colonne
- (5) partie médiane transversale
- (6) 2 rails
- (7) crémaillère
- (8) échelle graduée

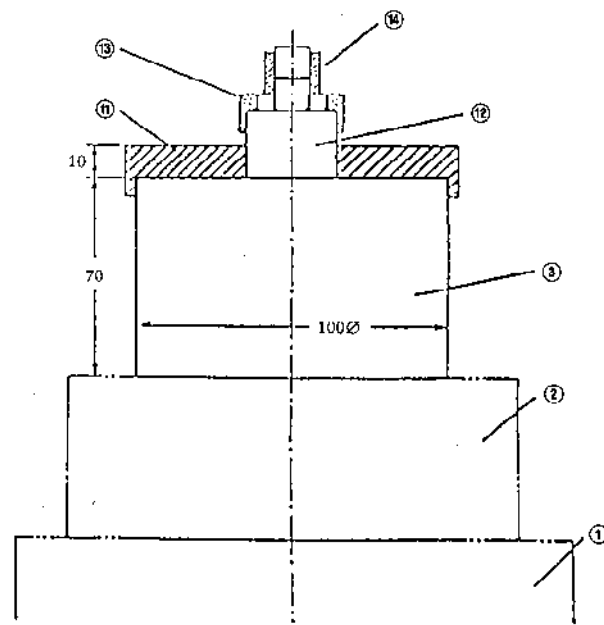


Fig. 4b Appareil à mouton partie inférieure

- (9) mouton (masse qui tombe)
- (10) dispositif de support et de libération
- (11) plaque de positionnement
- (12) enclume intermédiaire 26 (diamètre) × 26
- (13) bague de positionnement munie d'orifices
- (14) dispositif d'impact

Figure 4
suite

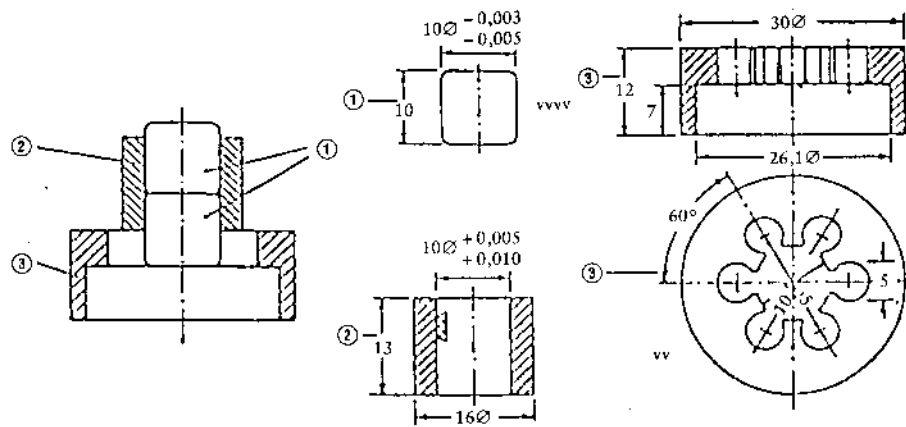


Fig.4c Dispositif de choc pour les substances sous forme de poudres ou de pâtes
(1) cylindres d'acier
(2) anneau de guidage pour les cylindres d'acier
(3) bague de positionnement munie d'orifices
(a) section verticale
(b) plan
(4) anneau de caoutchouc
(5) substance liquide (40 mm³)
(6) espace sans liquide

Fig.4d Dispositif de choc pour les substances liquides

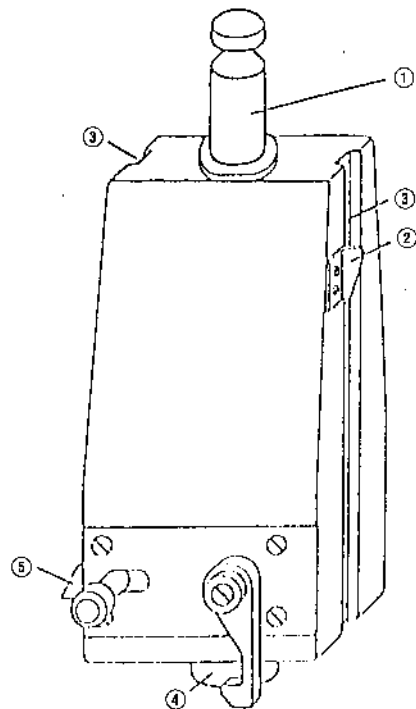
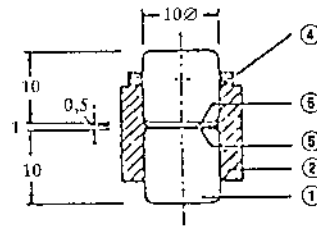
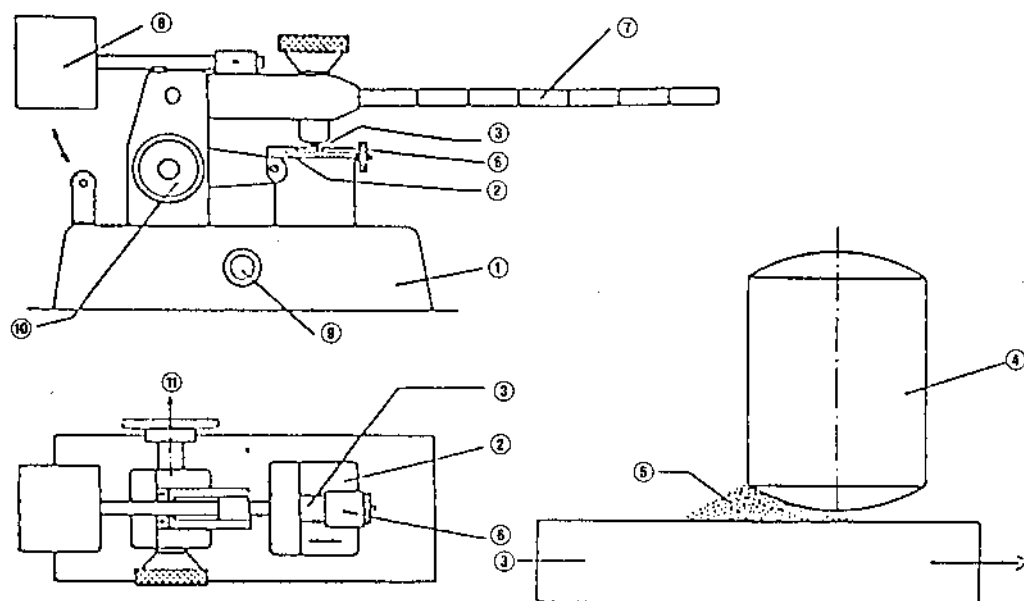


Fig.4c mouton(masse de 5 kg)

- (1) ergot de suspension
- (2) marqueur de hauteur
- (3) sillon de positionnement
- (4) tête d'impact cylindrique
- (5) arrêt de rebond

Figure 5

Appareil d'essai de sensibilité à la friction

Fig. 5a Appareil de friction
Vue de dessus et plane

- (1) Embase d'acier
- (2) Coulisseau mobile
- (3) Plaquette de porcelaine
25 × 25 × 5 mm
maintenue sur le coulisseau
- (4) Crayon de porcelaine fixe
10 mm (diamètre) × 15 mm
- (5) échantillon à essayer (10 mm³ environ)
- (6) Support de crayon

Fig 5b Position de départ du
crayon sur l'échantillon

- (7) Bras de charge
- (8) Contrepoids
- (9) Interrupteur
- (10) Roue permettant d'amener le coulisseau en position de départ
- (11) Vers un moteur électrique

A.15. TEMPERATURE D'INFLAMMATION SPONTANEE DES LIQUIDES ET DES GAZ

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosives qui s'enflamment spontanément au contact de l'air à température ambiante ne doivent pas être soumises à cet essai. Le mode opératoire est applicable aux gaz, aux liquides et aux vapeurs qui peuvent être enflammés par une surface chaude, en présence d'air.

La température d'inflammation spontanée peut être réduite considérablement par la présence d'impuretés catalytiques, par la matière de la surface ou par une augmentation du volume du récipient d'essai.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Le degré d'inflammabilité spontanée est exprimé en termes de température d'inflammation spontanée. La température d'inflammation spontanée est la température la plus basse à laquelle s'enflamme la substance à essayer mélangée avec de l'air dans les conditions définies dans la méthode d'essai.

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Les substances de références sont citées dans les normes (voir 1.6.3). Elles devraient servir en premier lieu à vérifier de temps à autre la fiabilité de la méthode et à permettre de comparer les résultats obtenus avec différentes méthodes.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode permet de déterminer la température minimale de la surface interne d'une enceinte qui provoquera l'inflammation d'un gaz, d'une vapeur ou d'un liquide injecté dans l'enceinte.

1.5. CRITERES DE QUALITE

La répétabilité varie en fonction de l'intervalle de température d'inflammation spontanée et de la méthode d'essai utilisée.

La sensibilité et la spécificité dépendent de la méthode d'essai utilisée.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

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 à essayer est essayé selon le point 1.6.3.

1.6.3. Mode opératoire

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

2. DONNEES

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

3. RESULTATS

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

- les spécifications précises de la substance (identité et impuretés),
- la quantité d'échantillon utilisée, la pression atmosphérique,
- l'appareil utilisé,
- les résultats des mesures (température d'essai, résultats concernant l'inflammation, laps de temps correspondants),
- toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

Aucune.

A.16. TEMPERATURE RELATIVE D'INFLAMMATION SPONTANEE POUR LES SOLIDES

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Les substances explosibles et les substances qui s'enflamment spontanément 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 soumises à de 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 production de chaleur excède la vitesse de perte de 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. DEFINITIONS ET UNITES

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. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

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, ou à la température du point de fusion si celle-ci est inférieure, à la vitesse de 0,5 °C/mn. Pour les besoins de cet essai, la température du four à laquelle l'échantillon atteint une température de 400 °C par auto-échauffement est appelée température d'inflammation spontanée.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Aucun.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Appareil

1.6.1.1. Four

Un four de laboratoire à température programmable (d'un volume de 2 litres environ) équipé d'une circulation d'air naturel et d'un clapet d'explosion. Pour éviter tout risque potentiel d'explosion, il convient d'empêcher que les gaz de décomposition puissent entrer en contact avec les éléments de chauffage électrique.

1.6.1.2. Cube en treillis de fil métallique

Couper un morceau de treillis en fil d'acier inoxydable d'une maille d'une taille de 0,045 mm, selon le modèle indiqué à la figure 1. Plier le treillis et l'attacher avec du fil métallique en forme de cube ouvert.

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

Les substances sont testées telles qu'elles sont reçues.

1.6.3. Mode opératoire

Remplir le cube de la substance soumise à essai. Tasser doucement en ajoutant de la substance jusqu'à le remplir complètement. Suspending ensuite le cube 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 du four.

Les températures du four et de l'échantillon sont enregistrées en continu pendant que la température du four est portée à 400 °C, ou au point de fusion si cette valeur est plus basse, à une vitesse de 0,5 °C/min.

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. DONNEES

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

3. RESULTATS

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

- une description de la substance à essayer;
- les résultats des mesures incluant la courbe température/temps;
- toute observation supplémentaire pertinente pour l'interprétation des résultats.

4. REFERENCES

(1) NF T 20-036 (septembre 1985), Produits chimiques à usage industriel — Détermination de la température relative d'inflammation spontanée des solides.

Figure 1

Modèle de cube d'essai de 20 mm

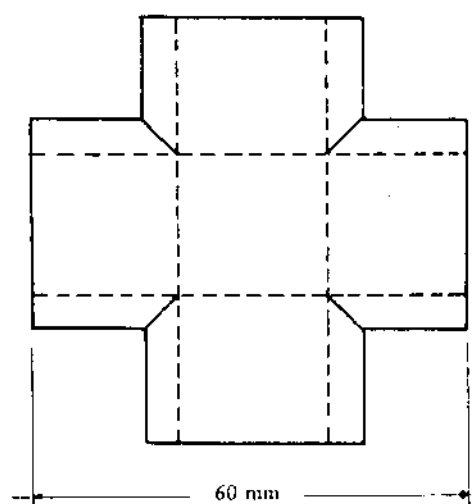
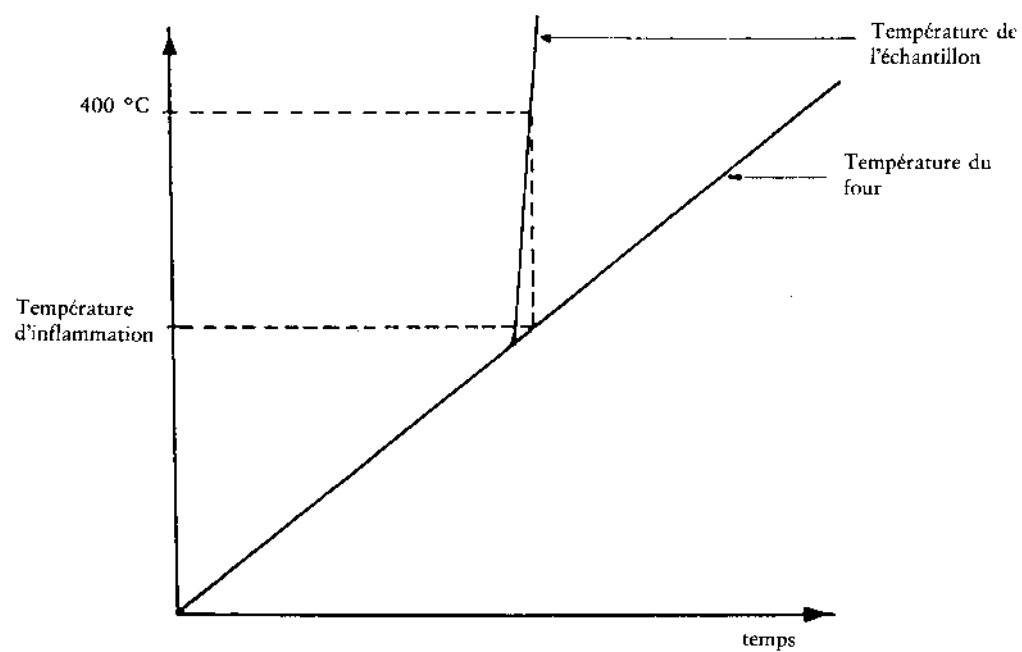


Figure 2

Courbe type température/temps



A.17 PROPRIETES COMBURANTES (SOLIDES)**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur les propriétés explosives éventuelles de la substance avant d'effectuer cet essai.

Cet essai n'est pas applicable aux liquides, aux gaz, aux substances explosives ou très inflammables ou aux peroxydes organiques.

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

Un essai préliminaire doit être effectué pour s'assurer que cet essai ne nécessite pas de précautions particulières.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Temps de combustion : temps de réaction, exprimé en secondes, pris par la zone de réaction pour se propager à travers un 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 10 à 90 % en poids de comburant.

1.3. SUBSTANCE DE REFERENCE

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

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 METHODE

Il convient, pour des raisons de sécurité, d'effectuer un essai préliminaire. Il est inutile de continuer l'essai si l'essai préliminaire montre clairement que la substance a des propriétés oxydantes. Lorsque ce n'est pas le cas, la substance est soumise à l'essai complet.

Dans l'essai complet, la substance à essayer et une substance combustible définie sont mélangées 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. CRITERES DE QUALITE

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 METHODE**1.6.1. Préparation****1.6.1.1. Substance à essayer**

L'échantillon à essayer est traité comme suit afin d'obtenir une granulométrie inférieure à 0,125 mm : tamiser la substance à essayer et 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.

Avant de préparer le mélange, sécher la substance à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Si la température de décomposition de la substance est inférieure à 105 °C, la substance doit être séchée à une température moins élevée.

1.6.1.2. Substance combustible

On utilise de la cellulose en poudre comme substance combustible. Elle doit être du type utilisé en chromatographie en couche mince ou en colonne. Un type de cellulose dont la longueur de plus de 85 % des fibres est comprise entre 0,020 mm et 0,075 mm s'est avérée adéquate. La poudre de cellulose est tamisée au moyen d'un tamis à mailles de 0,125 mm. Il faut utiliser le même lot de cellulose pour tout l'essai.

Avant de préparer le mélange, sécher la poudre de cellulose à 105 °C jusqu'à ce que son poids soit constant.

Si de la sciure de bois est utilisée lors de l'essai préliminaire, préparer une sciure de bois tendre qui passe au travers d'un tamis d'une maille de 1,6 mm, mélanger, puis sécher à 105 °C pendant 4 heures en couche de moins de 25 mm d'épaisseur. Refroidir la sciure et la conserver jusqu'à utilisation dans un récipient hermétique aussi rempli que possible. Elle sera de préférence utilisée dans les 24 heures après séchage.

1.6.1.3. Source d'allumage

Utiliser la flamme d'un brûleur à gaz (diamètre : 5 mm minimum). Si une autre source d'allumage est utilisée (par exemple lorsque l'essai est effectué dans une atmosphère inerte), fournir la description et la justification.

1.6.2. Mode opératoire

Note :

Les mélanges de comburants avec de la cellulose ou de la sciure de bois doivent être considérés comme des explosifs potentiels et manipulés avec prudence.

1.6.2.1. Essai préliminaire

La substance séchée est grossièrement mélangée à de la cellulose ou à de la sciure de bois sèche dans des proportions de 2 (substance à essayer) pour 1 (cellulose ou sciure de bois) en poids et le mélange est disposé en petit tas conique de 3,5 cm (diamètre de base) x 2,5 cm (hauteur) par remplissage sans tassement d'une forme conique (par exemple un entonnoir de laboratoire en verre dont le tube est bouché).

Le tas est placé sur une plaque froide, non-combustible, non poreuse, et peu thermo-conductrice. L'essai doit être conduit dans une hotte aspirante (voir point 1.6.2.2).

La source d'allumage est mise en contact avec le cône. L'intensité et la durée de la réaction sont observées et enregistrées.

La substance doit être considérée comme comburante si la réaction est intense.

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

1.6.2.2. Essai complet

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

On réalise un tas au moyen d'un moule métallique d'une longueur de 250 mm et dont la section triangulaire transversale a une hauteur intérieure de 10 mm et une largeur intérieure de 20 mm. Placer comme cadres latéraux des deux côtés du moule, dans le sens de la longueur, deux plaques métalliques dépassant de 2 mm le bord supérieur de la section triangulaire (figure). Remplir ce dispositif avec un excès de mélange, sans tasser. Après avoir laissé tomber le moule une fois d'une hauteur de 2 cm sur une surface dure, racler l'excès avec une raclette tenue obliquement. Enlever alors les cadres latéraux et égaliser la surface de la poudre à l'aide d'un rouleau. Disposer une plaque non-combustible non-poreuse et peu thermo-conductrice sur le moule, retourner et démouler.

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

Le débit d'air doit être suffisant pour empêcher les vapeurs de se répandre dans le laboratoire et il ne doit pas subir de modification au cours de l'essai. Le courant d'air doit former un écran entourant l'appareil.

Vu les propriétés hygroscopiques de la cellulose et de certaines substances à essayer, l'essai doit être effectué aussi rapidement que possible.

Enflammer une extrémité du tas par contact avec la flamme.

Mesurer le temps de réaction sur une distance de 200 mm après que la zone de réaction ait parcouru une distance initiale de 30 mm.

L'essai est effectué avec la substance de référence et au moins une fois avec chacun des mélanges de substance à essayer et de cellulose.

Si l'on trouve une vitesse maximale de combustion significativement plus grande que celle de la substance de référence, l'essai peut être arrêté; autrement, les essais doivent être répétés cinq fois avec chacun des trois mélanges qui donnent les vitesses de combustion les plus élevées.

Si l'on soupçonne que le résultat est un « faux positif », répéter l'essai en remplaçant la cellulose par une substance inerte dont la taille des particules est la même, comme le *kieselguhr*. Une autre possibilité consiste à renouveler l'essai avec le mélange substance à essayer/cellulose dont la vitesse de combustion est la plus élevée, dans une atmosphère inerte (contenu d'oxygène < 2 % v/v).

2. DONNEES

Pour des raisons de sécurité, la vitesse maximale de combustion — et non la valeur moyenne — 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 concentration de comburant. Déduire de ce graphique la vitesse de combustion maximale.

Les six vitesses de combustion mesurées au cours d'une même opération pour le mélange qui a donné la vitesse de combustion maximale 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).

Si les essais sont réalisés dans une atmosphère inerte, comparer la vitesse maximale avec la vitesse de réaction du mélange de référence dans une atmosphère inerte.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- l'identité, la composition, la pureté, le contenu en humidité etc., de la substance à essayer.
- tout traitement de l'échantillon à essayer (par exemple, broyage, séchage...).
- la source d'allumage utilisée dans les essais.
- les résultats des mesures.
- le type de réaction (par exemple combustion rapide superficielle, combustion à travers toute la masse, toute observation concernant les produits de combustion,...).
- toute observation supplémentaire, y compris une description de l'intensité (flamme, étincelle, fumée, lente incandescence, etc.) et la durée approximative de la réaction observée au cours de l'essai préliminaire de sécurité/dépistage pour la substance à essayer comme pour la substance de référence.
- les résultats des essais effectués avec un matériel inerte, s'il y a lieu.
- les résultats des essais effectués dans une atmosphère inerte, s'il y a lieu.

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

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 de la substance soumise à essai est supérieure ou égale à celle du mélange de référence composé de cellulose et de nitrate de barium.

Pour éviter un « faux » résultat positif, il faut aussi tenir compte des résultats obtenus en essayant la substance mélangée avec un matériel inerte et/ou dans une atmosphère inerte, lors de l'interprétation des résultats.

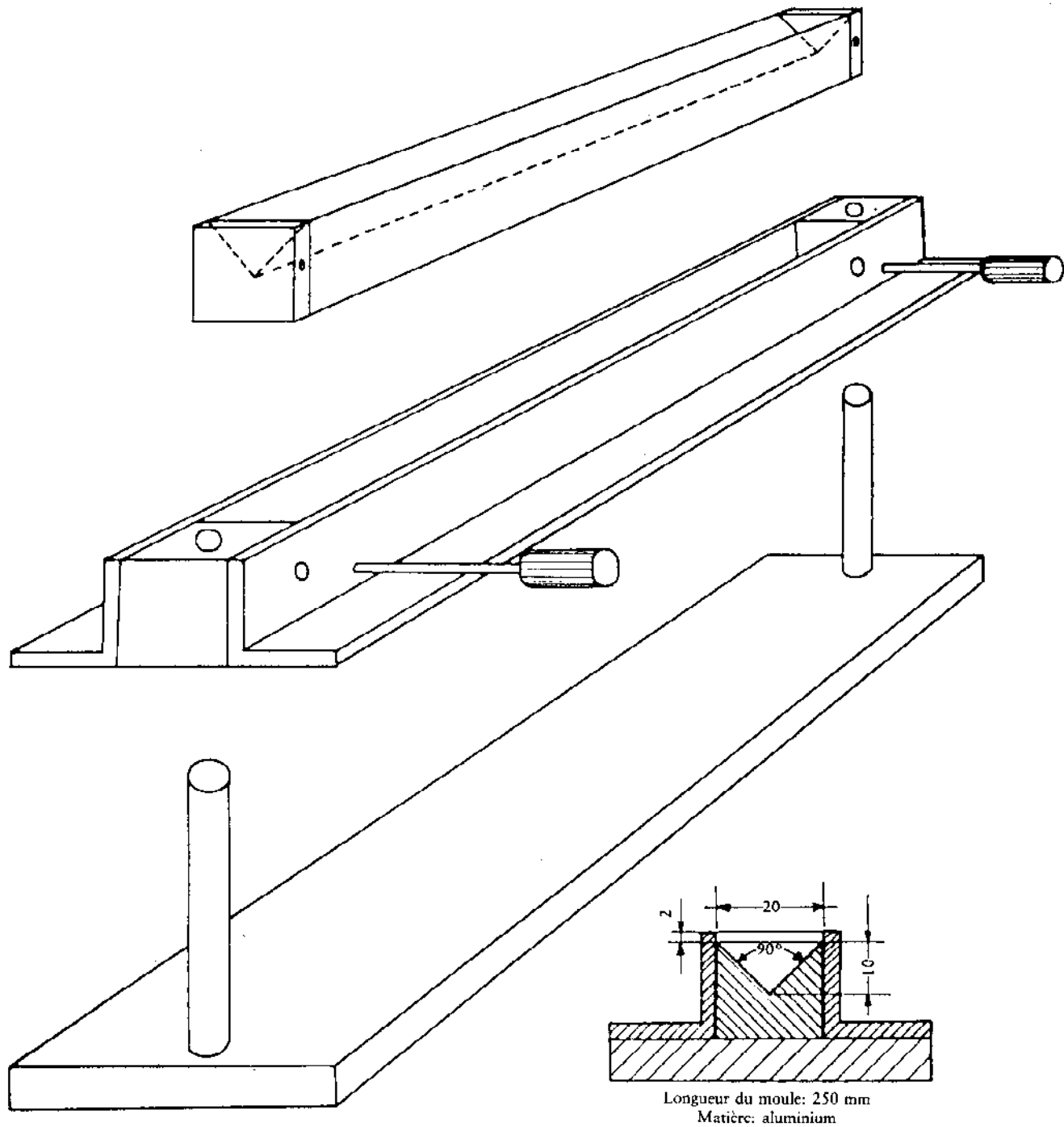
4. REFERENCES

(1) NF T 20-035 (septembre 1985). Produits chimiques à usage industriel — Détermination des propriétés comburantes des solides.

Annexe

Figure

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



PARTIE B : METHODES DE DETERMINATION DE LA TOXICITE

INTRODUCTION GENERALE : PARTIE B

A. INTRODUCTION

Voir l'introduction générale

B. DEFINITIONS

i) **La toxicité aiguë** exprime les effets néfastes qui se manifestent pendant une période donnée (habituellement 14 jours) après l'administration d'une dose unique de substance.

ii) **La DL₅₀** (dose létale médiane) est la dose unique déduite statistiquement, sensée provoquer la mort de 50 % des animaux auxquels la substance a été administrée. La valeur de la DL₅₀ est exprimée en poids de la substance étudiée rapporté à l'unité de poids corporel des animaux soumis à l'expérimentation (mg/kg).

iii) **La CL₅₀** (concentration létale médiane) est la concentration d'une substance déduite statistiquement qui devrait provoquer au cours d'une exposition ou après celle-ci, pendant une période définie la mort de 50 % des animaux exposés pendant une durée déterminée. La valeur de la CL₅₀ est exprimée en poids de substance étudiée rapportée à un volume standard d'air (milligramme par litre).

iv) **Le niveau d'exposition sans effet néfaste** correspond à la dose ou au niveau d'exposition maximal utilisé au cours d'un essai n'ayant pas produit de signe décelable de toxicité.

v) **La toxicité subaiguë/subchronique** inclut les effets néfastes qui apparaissent chez les animaux d'expérience lorsqu'ils reçoivent des administrations quotidiennes d'une substance ou lorsqu'ils sont exposés quotidiennement pendant une période brève en regard de leur espérance de vie.

vi) **La dose maximale tolérable (DMT)** correspond à la dose maximale provoquant, dans l'essai où elle est utilisée, des signes d'intoxication chez les animaux sans avoir d'effets majeurs sur leur survie.

vii) **L'irritation cutanée** correspond aux modifications cutanées réversibles de nature inflammatoire qui apparaissent après application d'une substance sur la peau.

viii) **L'irritation des yeux** correspond aux modifications oculaires réversibles qui apparaissent après application de la substance sur la surface antérieure de l'oeil.

ix) **La sensibilisation cutanée** (dermites allergiques de contact) est une réaction cutanée d'origine immunologique résultant du contact avec une substance.

Définitions spécifiques pour la toxicité par inhalation

— **un aérosol** est défini comme un ensemble de particules (solides et/ou liquides) dispersées dans l'air d'une manière homogène,

— **le diamètre aérodynamique** d'une particule est le diamètre d'une sphère de densité unitaire (1 g cm⁻³) présentant la même vitesse finale de sédimentation que la particule en question,

— **le diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM)** est le diamètre aérodynamique calculé qui correspond au 50e centile de la distribution dimensionnelle relative à la masse des particules de l'aérosol,

— **l'écart-type géométrique (ETG)** est le rapport du 84e centile sur le 50e centile estimés; Il indique la pente de la courbe de distribution cumulée de la taille des particules, en supposant que la distribution de taille est log normale.

Définitions spécifiques de la méthode de la dose fixée pour l'étude de la toxicité aiguë par voie orale

— **Le terme «toxicité évidente»** correspond aux effets toxiques consécutifs à l'administration de la substance d'essai, dont la sévérité est telle que l'administration d'une dose immédiatement supérieure pourrait entraîner la mort.

— **La «dose discriminante»** est la plus forte des quatre doses fixées pouvant être administrée sans provoquer de mortalité (y compris les animaux euthanasiés).

C. MUTAGENESE (y compris essai de dépistage de la cancérogénèse)

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 essais suivants :

i) des tests fondés sur l'apparition de mutations géniques (ponctuelles) sur des cellules procaryotes telles que *Salmonella typhimurium*; il est possible également d'utiliser *Escherichia coli*. Le choix entre ces deux organismes peut être déterminé par la nature de la substance à étudier;

ii) des tests fondés sur la production d'aberrations chromosomiques sur des cellules de mammifères cultivées *in vitro*; on peut également opérer *in vivo* (essai du micronoyau ou analyse des métaphases de cellules de moelle osseuse). Cependant, en l'absence de contre-indications, les méthodes *in vitro* sont fortement recommandées.

D. EVALUATION ET INTERPRETATION

L'extrapolation directe à l'homme des résultats obtenus par l'expérimentation animale et ceux obtenus *in vitro* ne peut se pratiquer que dans certaines limites; il faut en tenir compte lors de l'évaluation et de l'interprétation des essais de toxicité.

Lorsqu'elles sont disponibles, les informations sur des effets nocifs rapportés chez des personnes exposées au produit, peuvent être utilisables pour déterminer les propriétés toxiques potentielles sur l'homme.

E. REFERENCES 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 de l'OCDE.

Remarques complémentaires

Soins à apporter aux animaux

Lors des expérimentations toxicologiques, il est essentiel de procéder à des contrôles rigoureux des conditions ambiantes et d'utiliser des techniques appropriées au soin des animaux.

i) conditions d'hébergement

Les conditions ambiantes des locaux ou enceintes où ont lieu les expérimentations doivent être adaptées à l'espèce utilisée pour l'essai. Pour les rats, souris et cobayes, la température du local doit être de 22 ± 3 °C et l'humidité relative de 30 à 70 %; pour les lapins, la température doit être de 20 ± 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 adéquates sont incluses dans la description de la méthode. Dans toutes les recherches sur les effets toxiques, la température et l'humidité doivent être contrôlées, enregistrées et consignées dans le rapport final d'étude.

Lorsque l'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 les animaux, il est important d'indiquer le type de cage utilisé ainsi que le nombre d'animaux placés 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 les 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 constituant de l'alimentation.

La possibilité d'une telle réaction doit être considérée lors de l'interprétation des résultats de l'essai.

Il faut veiller à ce que les impuretés contenues dans le régime alimentaire et connues pour influencer la toxicité ne soient pas présentes en concentration telle qu'elles puissent interférer.

Protection des animaux

Les méthodes d'essai ont été élaborées en accordant l'importance qui est due à la protection des animaux. Quelques exemples sont brièvement cités ci-après, mais cette liste n'est pas exhaustive. Pour en connaître les termes et/ou conditions exacts, se référer à l'énoncé des méthodes.

— Une autre méthode, la « méthode des doses fixes » est introduite pour définir la toxicité orale aiguë. Dans cette méthode, ce n'est pas la mort qui sert de moyen de mesure de la toxicité. Moins d'animaux sont employés et détresse et souffrances sont moindres que dans la méthode traditionnelle de détermination de la toxicité orale aiguë.

— Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum scientifiquement acceptable : cinq animaux seulement du même sexe sont testés par dose pour les méthodes B.1 et B.3; 10 animaux seulement (et 5 seulement pour le groupe témoin négatif) sont utilisés pour déterminer la sensibilisation cutanée par la méthode de maximalisation chez le cobaye (méthode B.6), le nombre d'animaux nécessaires comme témoins positifs pour étudier la mutagénicité *in vivo* est également réduit (méthode B.11 et B.12).

— La souffrance et la détresse des animaux pendant les essais sont atténuées : les animaux présentant des signes importants et persistants de détresse et de souffrance peuvent être euthanasiés; il n'est pas nécessaire d'administrer les substances connues pour provoquer une détresse et des douleurs importantes du fait de leurs propriétés corrosives ou irritantes (méthodes B.1, B.2 et B.3).

— L'introduction d'essais « limites » non seulement pour la toxicité aiguë (méthode B.1, B.2 et B.3) mais également pour la mutagénicité *in vivo* (méthodes B.11 et B.12) permet d'éviter la réalisation de tests à des doses inutilement élevées.

— Une stratégie d'essais en vue de détermination des propriétés irritantes permet maintenant de ne pas effectuer l'essai, ou de le limiter à un seul animal lorsqu'on dispose d'éléments scientifiques suffisants.

Ces informations d'ordre scientifique peuvent reposer sur les propriétés physico-chimiques de la substance, sur les résultats d'autres essais déjà réalisés, ou sur les résultats de méthodes *in vitro* validées. Par exemple si la substance a été soumise à une étude de toxicité aiguë par administration cutanée à la dose de l'essai limite (méthode B.3) et qu'aucune irritation cutanée n'a été décelée, il peut être inutile d'effectuer des essais supplémentaires relatifs à l'irritation cutanée (méthode B.4); les produits qui se sont révélés corrosifs ou responsables d'une irritation grave au cours d'une étude d'irritation cutanée (méthode B.4) ne doivent pas être soumis à des essais supplémentaires d'irritation oculaire (méthode B.5).

B.1 TOXICITE AIGUE (ORALE)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Des doses croissantes de la substance à étudier sont administrées par voie orale, par gavage, à plusieurs lots d'animaux d'expérience, une seule dose étant utilisée par lot. Le choix des doses peut reposer sur les résultats d'un essai préliminaire. On observe ensuite les effets et la mortalité dus à la substance. Les animaux qui meurent pendant l'essai ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience sont autopsiés. (Cette méthode s'applique essentiellement aux essais pratiqués sur des rongeurs.)

Si des animaux montrent des signes d'inconfort et de douleurs intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai avec des substances connues pour entraîner une détresse ou des douleurs intenses du fait de leurs propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expériences. Si nécessaire, la substance à tester est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé d'utiliser en priorité une solution aqueuse chaque fois que cela est possible, sinon on peut utiliser une solution dans une 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 ml/kg de poids corporel, sauf s'il s'agit de solutions aqueuses, pour lesquelles on peut utiliser jusqu'à 20 ml/kg de poids corporel. Pour minimiser la variabilité du volume d'essai, les concentrations doivent être ajustées de façon à réaliser les administrations sous volume constant.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

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

Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Cinq rongeurs au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être du même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non-gravides. Si l'on dispose d'informations indiquant qu'un sexe est nettement plus sensible, on utilisera des animaux de ce sexe.

Note : Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux pour les tests de toxicité aiguë sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en multipliant les efforts visant à ne pas dépasser des doses modérément toxiques.

Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. Doses

Les doses doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées de façon à 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 acceptable de la DL50.

1.6.2.4. Essai « limite »

Si l'on utilise des rongeurs, un essai « limite » peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre sur 14 jours au moins. Cependant sa durée ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être déterminée en fonction des effets toxiques, de leur vitesse d'apparition et de la durée de la période de récupération; elle peut donc être prolongée si nécessaire. Les moments où les signes de toxicité apparaissent et disparaissent ainsi que celui de la mort sont importants, surtout en cas de mortalité 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 n'est pas limitée. Le lendemain, les animaux doivent être pesés et la substance à tester leur est ensuite administrée par gavage sous forme d'une dose unique. 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 a été administrée par fractions pendant un certain laps de temps, il peut être 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 consignées 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 pratiqué 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 en pratiquant l'autopsie ou la conservation au froid des animaux trouvés morts ainsi qu'en isolant et en sacrifiant les animaux faibles ou moribonds. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, ainsi que des systèmes respiratoire, circulatoire et nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. 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 notées. Si nécessaire, les tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené l'étude à terme sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée à au moins un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifiée dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont nettement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux 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 noté peu de temps avant l'administration de la substance à tester, puis une fois par semaine et au moment de sa mort. Les modifications de poids doivent être calculées et consignées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié. La DL50 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 à tester et l'apparition ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les anomalies du comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.;
- conditions expérimentales;
- doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et de la concentration);
- sexe des animaux utilisés;
- tableau des résultats par sexe et par dose (à savoir, nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés);
- moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux;
- toutes les observations;
- valeur de la DL_{50} pour le sexe soumis à l'étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul);
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50} (lorsque le calcul est possible);
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet);
- résultats d'autopsie;
- résultats des examens histopathologiques;
- résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe;
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur calculée de la DL_{50} les animaux euthanasiés au cours de l'essai);
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.1.BIS TOXICITE AIGUE (ORALE) — METHODE DE LA DOSE FIXEE

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale, partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Néant.

1.4. PRINCIPES DE LA METHODE D'ESSAI

L'essai de toxicité aiguë par voie orale fournit des informations sur les effets néfastes susceptibles d'apparaître peu de temps après l'ingestion d'une dose unique de la substance d'essai.

La méthode de la dose fixée se déroule en deux stades.

Lors d'une étude préliminaire, on détermine, de manière séquentielle, les effets de plusieurs doses administrées chacune oralement par gavage à un seul animal d'un même sexe. Cette étude préliminaire donne des informations sur la relation dose-effet et permet d'estimer la dose minimale létale. Normalement, pas plus de cinq animaux ne sont utilisés dans ce premier stade.

Lors de l'étude principale, la substance est administrée oralement, par gavage, à un lot de cinq mâles et un lot de cinq femelles, en utilisant une dose unique choisie parmi les doses fixes (5, 50, 500 ou 2 000 mg/kg). La dose à utiliser est déduite de l'étude préliminaire et est celle supposée devoir produire une « toxicité manifeste » (voir 1.2. Définitions), sans entraîner la mort.

On observe ensuite les effets.

Lorsque la dose initialement retenue entraîne des effets toxiques manifestes mais sans mortalité liée au composé, aucun essai ultérieur n'est nécessaire.

Lorsqu'aucune toxicité manifeste n'apparaît à la dose retenue, il convient de répéter l'essai avec la dose immédiatement supérieure. Si des animaux meurent ou si, en raison de la sévérité des effets toxiques, il est nécessaire d'euthanasier des animaux, il convient de répéter l'essai avec la dose immédiatement inférieure.

Cette méthode permet d'identifier la « dose discriminante » (voir 1.2. Définitions), c'est-à-dire la plus élevée des doses fixes pouvant être administrée sans entraîner la mort ou la nécessité d'euthanasier.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsqu'on sait que la substance à étudier peut entraîner une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparations

1.6.1.1. Animaux d'expérience

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

Il faut utiliser des souches d'animaux de laboratoire courantes. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation de poids des animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant de commencer l'essai, des animaux adultes jeunes et sains sont répartis au hasard dans les différents lots, pour l'étude préliminaire et pour l'étude principale. Il se peut qu'en pratique, un lot seulement de chaque sexe soit nécessaire pour l'étude principale.

1.6.1.2. Préparation et administration de la dose

Au besoin, la substance d'essai est dissoute ou mise en suspension dans un véhicule approprié. Il est recommandé d'utiliser en priorité une solution aqueuse chaque fois que cela est 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 ml/kg de poids corporel, sauf s'il s'agit de solutions aqueuses, pour lesquelles on peut utiliser 20 ml/kg. Pour minimiser la variabilité du volume d'essai, les concentrations doivent être ajustées de façon à réaliser les administrations sous volume constant.

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; l'eau n'est 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. Si l'administration d'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 être privés de nourriture pendant trois à quatre 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.

1.6.2. Mode opératoire

1.6.2.1. Etude préliminaire

Les effets de différentes doses sont déterminés en utilisant un seul animal par dose. En l'absence d'information montrant que les mâles seraient plus sensibles, on utilisera des animaux femelles. L'administration se fait de façon séquentielle, en laissant au moins 24 heures avant d'administrer la substance à l'animal suivant. Chaque animal est soigneusement observé pendant au moins 7 jours pour les signes de toxicité; si des signes de toxicité modérée persistent au septième jour, l'animal est maintenu en observation pendant une période pouvant aller jusqu'à 7 jours supplémentaires. La gamme de doses suivantes est essayée dans un premier temps : 5, 50, 500 et 2 000 mg/kg. Si la première dose ne produit pas de toxicité importante, et que le niveau immédiatement supérieur entraîne une mortalité, il peut être nécessaire d'essayer une ou plusieurs doses intermédiaires, afin d'obtenir des informations sur la (les) doses qui produi(ent) des signes de toxicité et sur la dose minimale qui cause la mortalité.

Il faut essayer de choisir la première dose en se basant sur des informations provenant d'autres produits chimiques de la même famille. En l'absence d'une telle information, il est conseillé de commencer par la dose de 500 mg/kg. Si l'on n'observe pas de signes de toxicité à la première dose, la dose immédiatement supérieure est employée. Si la dose de 2 000 mg/kg ne provoque pas de mortalité, l'étude préliminaire est terminée, et l'étude principale sera effectuée avec cette dose. Si l'on observe des effets sévères, nécessitant l'euthanasie, à la dose initiale (par exemple 500 mg/kg), la dose immédiatement inférieure (par exemple 50 mg/kg) est administrée à un autre animal. Si celui-ci survit, on peut alors administrer des doses intermédiaires, judicieusement choisies entre les doses fixées. Normalement, on n'utilise pas plus de cinq animaux au cours de cet essai.

1.6.2.2. Etude principale

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles) doivent être utilisés pour chaque dose étudiée. Les femelles doivent être nullipares et non gravides.

La méthode des doses fixes veut, par principe, que l'on utilise seulement des doses entraînant une toxicité modérée. On devra donc éviter l'administration de la substance d'essai à des doses létales.

La dose à utiliser dans l'essai doit être sélectionnée parmi l'une des quatre doses fixes, à savoir 5, 50, 500 ou 2 000 mg/kg de poids corporel. La première dose retenue doit être celle susceptible de produire des effets toxiques manifestes mais aucune mortalité liée au composé (y compris les animaux euthanasiés; les morts accidentelles ne sont pas prises en compte mais doivent être consignées). Il est superflu de réaliser un essai ultérieur lorsque la dose produit des effets toxiques manifestes mais aucune mortalité liée au composé.

Lorsque la dose choisie ne produit aucun effet toxique manifeste, il convient de répéter l'essai avec la dose immédiatement supérieure. Les animaux doivent, néanmoins, être maintenus sous observation jusqu'au terme de la période prévue. Lorsqu'une réaction toxique sévère requiert l'euthanasie des animaux, ou lorsque l'on constate une mortalité liée au composé, il convient de répéter l'essai avec la dose immédiatement inférieure, les animaux ne nécessitant pas d'euthanasie doivent être maintenus sous observation pendant toute la période prévue.

Une fois la substance administrée, les observations sont effectuées et enregistrées de façon systématique, une fiche individuelle devant être établie pour chaque animal.

La période d'observation doit au moins s'étendre sur 14 jours. Cependant, sa durée ne doit pas être limitée 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 en cas de mortalité retardée.

Un examen clinique attentif doit être fait au moins deux fois le jour de l'administration de la substance et au moins une fois par jour ensuite. Les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse doivent être euthanasiés. Des observations complémentaires sont nécessaires les premiers jours suivant l'administration si les animaux continuent à présenter des signes de toxicité. Il peut être mis fin à l'essai s'il apparaît que la dose initialement retenue était trop élevée.

L'observation doit porter 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. Une attention particulière sera portée à l'apparition de tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma.

Chaque animal doit être pesé peu de temps avant l'administration de la substance d'essai, puis quotidiennement au cours des trois jours suivants et enfin, une fois par semaine. Les animaux qui meurent pendant l'expérience et ceux qui survivent à la fin de l'expérience, sont pesés et autopsiés. Toutes les modifications pathologiques macroscopiques doivent être consignées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés en vue d'un examen histo-pathologique.

L'étude d'une deuxième ou, exceptionnellement, d'une troisième dose peut être nécessaire en fonction des résultats obtenus pour la dose précédente.

Si une substance se révèle létale à une dose de 5 mg/kg de poids corporel (ou lorsqu'une étude préliminaire indique que cette dose entraînera la mort), il peut être nécessaire de poursuivre l'étude de la toxicité aiguë de la substance.

2. DONNEES

Les données de l'étude préliminaire et de l'étude principale doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque dose testée, le nombre d'animaux au début de l'essai; le nombre d'animaux présentant des signes de toxicité, le nombre d'animaux trouvés morts pendant l'essai ou euthanasiés, une description des effets toxiques ainsi que, pour l'étude principale, l'existence d'effets toxiques manifestes liés au composé; l'évolution de tout effet toxique et les résultats de l'autopsie. Les modifications de poids doivent être calculées et notées lorsque la survie dépasse une journée.

Les animaux euthanasiés en raison d'un état de détresse et de souffrance lié au composé sont enregistrés comme s'ils étaient morts du fait du composé étudié.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants, à la fois pour l'étude préliminaire et l'étude principale :

- espèces, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.;
- conditions expérimentales;
- doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et de la concentration);
- résultats complets pour toutes les doses étudiées;
- tableau des données par sexe et par dose (nombre d'animaux utilisés, modifications du poids corporel; nombre d'animaux morts ou euthanasiés pendant l'essai; nombre d'animaux présentant des signes de toxicité; nature, sévérité et durée des effets;
- le moment d'apparition des signes de toxicité et leur éventuelle réversibilité;
- lorsque des animaux sont morts ou ont été euthanasiés, le moment de la mort après l'administration, les motifs et critères pour lesquels les animaux ont été euthanasiés;
- résultats d'autopsie;
- résultats d'examen histo-pathologiques;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats, y compris les signes manifestes de toxicité et la dose discriminante identifiée dans l'essai.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

DOSE	RÉSULTATS	INTERPRÉTATION
5 mg/kg poids corporel	Survie inférieure à 100 %	Composés très toxiques
	Survie égale à 100 % mais toxicité manifeste	Composés toxiques
	Survie égale à 100 %, pas de toxicité manifeste	Voir résultats pour 50 mg/kg
50 mg/kg poids corporel	Survie inférieure à 100 %	composés pouvant être toxiques ou très toxiques. Voir résultats pour 5 mg/kg
	Survie égale à 100 % mais toxicité manifeste	Composés nocifs.
	Survie égale à 100 %	pas de toxicité manifeste Voir résultats pour 500 mg/kg
500 mg/kg poids corporel	Survie inférieure à 100 %	Composés pouvant être toxiques ou nocifs Voir résultats pour 50 mg/kg
	Survie égale à 100 % mais toxicité manifeste	Composés considérés comme dépourvus de toxicité aiguë significative
	Voir résultats pour 2 000 mg/kg	Survie égale à 100 % pas de toxicité manifeste
2 000 mg/kg poids corporel	Survie inférieure à 100 %	Voir résultats pour 500 mg/kg
	Survie égale à 100 % avec ou sans toxicité manifeste	Composés dépourvus de toxicité aiguë significative

Voir également introduction générale, partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale, partie B (point E).

B.2. TOXICITE AIGUE (inhalation)**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la distribution de la taille des particules, la pression de vapeur, le point de fusion, le point d'ébullition, le point d'éclair et l'explosivité (le cas échéant) de la substance.

Voir également l'introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés à des concentrations croissantes de la substance à tester 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'essai sont autopsiés ainsi que ceux qui survivent à la fin de l'expérience.

Si des animaux montrent des signes d'inconfort et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier peut entraîner une détresse ou des douleurs intenses du fait des propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE**1.6.1. Préparation**

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant au moins les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans les différents lots d'expérience. Il n'est pas nécessaire de soumettre les animaux témoins à une exposition simulée, à moins que le dispositif d'exposition utilisé ne l'exige.

Il peut être nécessaire de microniser les substances solides à tester afin de les réduire en particules d'une taille appropriée.

On peut, au besoin, ajouter à la substance à tester un véhicule approprié en vue d'obtenir la concentration adéquate de celle-ci dans l'atmosphère; il faut alors prévoir un groupe témoin pour ce véhicule. Si un véhicule ou d'autres additifs sont utilisés pour faciliter l'administration, ils doivent être non toxiques et il est possible de s'appuyer pour cela sur des données bibliographiques appropriées.

1.6.2. Conditions de l'essai**1.6.2.1. Animaux d'expérience**

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce préférée. Il faut utiliser des souches courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe, au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder ± 20 % de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix rongeurs au moins (cinq femelles et cinq mâles) sont utilisés pour chaque niveau de concentration. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés.

Note : Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux pour les tests de toxicité aiguë sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les concentrations doivent être soigneusement choisies, en multipliant les efforts visant à ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

1.6.2.3. Concentrations d'exposition

Les concentrations doivent être en nombre suffisant, au moins trois, et espacées correctement 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 acceptable de la CL_{50} .

1.6.2.4. Essai « limite »

Si une exposition de 5 mâles et de 5 femelles, à une concentration de 20 mg/l d'un gaz ou 5 mg/l 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. Temps d'exposition

La durée de l'exposition doit être de quatre heures.

1.6.2.6. Dispositif expérimental

Les animaux doivent être exposés à la substance au moyen d'un dispositif d'exposition dynamique capable de maintenir un courant d'air permettant au moins 12 renouvellements de l'atmosphère de l'enceinte d'exposition par heure, et assurant une teneur suffisante en oxygène ainsi qu'une répartition uniforme du produit à tester dans l'atmosphère de l'enceinte d'exposition. Si l'on utilise une chambre d'exposition, celle-ci doit être conçue de manière à éviter autant que possible l'entassement des animaux et à optimiser l'exposition par inhalation à la substance d'essai. En règle générale, pour assurer la stabilité de la composition 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 soit oro-nasal, soit de la tête seule, soit du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition présentent l'avantage de limiter la pénétration de la substance d'essai par d'autres voies.

1.6.2.7. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant, cette durée ne doit pas être limitée 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 si nécessaire. Le moment d'apparition ou de disparition des symptômes de toxicité ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de mortalité retardée.

1.6.3. Mode opératoire

Peu de temps avant l'exposition, les animaux sont pesés, puis exposés à la concentration d'essai dans l'appareillage décrit pendant une durée de quatre heures après stabilisation de la concentration dans la chambre. La stabilisation doit être rapide. La température à laquelle s'effectue l'essai doit être maintenue à $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. L'idéal est de maintenir l'humidité relative entre 30 et 70 %, mais, dans certains cas (par exemple certains essais d'aérosols), cela peut être impossible. Le maintien d'une pression légèrement négative à l'intérieur de la chambre (par exemple 5 mm d'eau) empêchera la substance d'essai de s'échapper dans le laboratoire. La nourriture et l'eau doivent être retirées pendant l'exposition. Il convient d'utiliser un dispositif permettant de produire et de contrôler l'atmosphère d'essai. Le système doit permettre de créer des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible. La chambre doit être conçue et fonctionner de telle façon qu'il y soit maintenue une distribution homogène de la substance dans l'atmosphère.

Il convient de mesurer ou de surveiller :

- a) le débit d'air (en permanence).
- b) la concentration réelle de la substance d'essai. Elle doit être mesurée dans la zone de respiration au moins trois fois au cours de l'exposition (certaines atmosphères, comme les aérosols à forte concentration, peuvent nécessiter un contrôle plus fréquent). 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 certains aérosols, ce degré de précision peut ne pas être obtenu et un écart plus grand est alors acceptable. En ce qui concerne les aérosols, la taille des particules doit être analysée aussi souvent que nécessaire (au moins une fois par groupe d'exposition).
- c) la température et l'humidité, en permanence si possible.

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 pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en agissant de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple grâce à l'autopsie ou à la conservation au froid des animaux trouvés morts ainsi qu'en isolant et en sacrifiant des animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée à la respiration, aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. Le moment de la mort doit être noté avec autant de précision que possible. Le poids de chaque animal doit être déterminé chaque semaine 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 l'expérience sont autopsiés en recherchant en particulier toutes les modifications des voies respiratoires supérieures et inférieures. Toutes les modifications doivent être consignées. Si nécessaire, des tissus doivent être prélevés pour un examen histopathologique.

2. DONNEES

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 de l'autopsie. Le poids de chaque animal doit être déterminé et enregistré lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause de l'inconfort et des souffrances dus à la substance sont enregistrés en tant que morts dues à la substance. La CL_{50} doit être déterminée selon une méthode reconnue. L'évaluation des données doit inclure la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la gravité de toutes les anomalies, y compris les anomalies du comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les changements de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.;
- conditions de l'essai : description de l'appareillage d'exposition, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système de génération produisant l'aérosol, méthode de conditionnement d'air et, le cas échéant, stabulation des animaux en chambre d'essai. Le dispositif de mesure de la température, de l'humidité, de la concentration des aérosols et de la distribution de la taille des particules doit être décrit.

Données relatives à l'exposition :

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

- a) débit d'air dans 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) diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) et écart-type géométrique (ETG);
- g.) durée de stabilisation;
- h) durée d'exposition :
 - tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir, nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés);
 - moment de la mort pendant ou après exposition, raisons et critères pour lesquels les animaux ont été euthanasiés;
 - toutes les observations;
 - valeur de la CL_{50} pour les animaux de chaque sexe, déterminée à la fin de la période d'observation (en précisant la méthode de calcul);
 - intervalle de confiance de 95 % pour la CL_{50} (lorsque le calcul est possible);

- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet);
- résultats d'autopsie;
- tous les résultats d'examen histopathologiques;
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur calculée de la CL₅₀, les animaux euthanasiés au cours de l'essai) :
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.3. TOXICITE AIGUE (cutanée)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

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

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier; il n'y a pas lieu d'effectuer l'essai lorsque l'on sait que l'administration de la substance à étudier entraîne une détresse ou des douleurs intenses du fait de ses propriétés corrosives ou irritantes.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux adultes jeunes et sains sont distribués selon les règles du hasard dans 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 suffisamment humectée au moyen d'eau ou, au besoin, d'un véhicule approprié, de manière à assurer 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 de l'essai

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 courantes d'animaux de laboratoire. Pour chaque sexe au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder, $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Cinq animaux au moins sont utilisés pour chaque dose. Ils doivent être de même sexe. Si l'on utilise des femelles, elles doivent être nullipares et non-gravidés. Si l'on dispose d'informations qui montrent qu'un sexe est nettement plus sensible, les essais seront pratiqués sur des animaux de ce sexe.

Note : Il faut essayer d'utiliser un nombre plus restreint d'animaux lorsque les tests de toxicité aiguë sont effectués sur des animaux appartenant à un ordre plus élevé que celui des rongeurs. Les doses doivent être soigneusement choisies, en s'efforçant au maximum de ne pas dépasser des doses modérément toxiques. Il faut éviter dans ce type d'essais d'administrer des doses létales de la substance à tester.

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 acceptable de la DL₅₀.

1.6.2.4. Essai « limite »

Un essai « limite » peut être effectué en administrant une dose au moins égale à 2 000 mg/kg de poids corporel au moins à un lot de 5 mâles et 5 femelles, en suivant le mode opératoire décrit ci-après. Si l'on observe une mortalité due à la substance, il peut être nécessaire de réaliser une étude complète.

1.6.2.5. Période d'observation

La période d'observation doit s'étendre au moins sur 14 jours. Cependant sa durée ne doit pas être limitée 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 signes de toxicité apparaissent et disparaissent, leur durée ainsi que le moment de la mort sont importants, surtout en cas de tendance à une mortalité 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 mince 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.

A la fin de la période d'application, la substance d'essai résiduelle 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 consignées 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 pratiqué au moins une fois par jour ouvrable, d'autres observations doivent être faites quotidiennement, en prenant des mesures de façon à réduire le nombre d'animaux perdus pour l'étude, par exemple : autopsie ou conservation au froid des animaux trouvés morts ainsi qu'en isolant et sacrifiant les animaux faibles ou moribonds.

Les observations doivent concerner les modifications des poils, de la peau traitée, des yeux, des muqueuses ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, et enfin de l'activité somato-motrice et du comportement. Une attention particulière sera apportée aux tremblements, convulsions, salivation, diarrhées, léthargie, sommeil et coma. 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 pour un examen histopathologique.

Estimation de la toxicité pour l'autre sexe

Après avoir mené à terme l'étude portant sur des animaux appartenant à un sexe, la substance est administrée au moins à un lot de 5 animaux de l'autre sexe, afin de déterminer si les animaux de ce sexe ne sont pas nettement plus sensibles à la substance à tester. L'utilisation d'un plus petit nombre d'animaux peut être justifié dans des circonstances particulières. Si l'on dispose d'informations appropriées qui montrent que les animaux du sexe testé sont considérablement plus sensibles, on peut se dispenser d'effectuer des essais sur les animaux de l'autre sexe.

2. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux 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 signes d'intoxication, la description des effets toxiques et les résultats de l'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 modifications du poids doivent être calculées et enregistrées lorsque la survie dépasse une journée. Les animaux qui sont euthanasiés à cause des souffrances et de l'inconfort dus à la substance sont enregistrés comme s'ils étaient *morts* du fait du composé étudié. La DL_{50} doit être déterminée par application d'une méthode reconnue.

L'évaluation des données doit inclure une évaluation de la relation, si elle existe, entre l'exposition des animaux à la substance à tester et l'apparition ainsi que la sévérité de toutes les anomalies, y compris les anomalies de comportement et les anomalies cliniques, les lésions macroscopiques, les modifications de poids corporel, la mortalité et tout autre effet toxique éventuel.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc..
- conditions expérimentales (y compris le procédé de nettoyage de la peau et le type de pansement : occlusif ou non).
- doses (avec indication du véhicule le cas échéant, et des concentrations).
- sexe des animaux sur lesquels l'essai a été réalisé.
- tableau de données de réponses par sexe et par dose (à savoir, nombre d'animaux morts ou sacrifiés au cours de l'essai, nombre d'animaux présentant des symptômes d'intoxication, nombre d'animaux exposés).
- moment de la mort après administration, raisons et critères justifiant l'euthanasie des animaux.
- toutes les observations.
- valeur de la DL_{50} pour le sexe soumis à une étude complète, déterminée à 14 jours (en précisant la méthode de calcul).
- intervalle de confiance de 95 % pour la DL_{50} , lorsque le calcul est possible.
- courbe dose/mortalité et pente de cette courbe (lorsque la méthode de calcul le permet).
- résultats d'autopsie.
- toutes les constatations histopathologiques.
- résultats de tout essai réalisé sur l'autre sexe.
- discussion des résultats (en tenant compte, en particulier, de l'effet que peuvent avoir sur la valeur de la DL_{50} calculée les animaux euthanasiés au cours de l'essai).
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.4. TOXICITE AIGUE (irritation de la peau)**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

Considérations préliminaires

Il convient de prendre en considération toutes les informations disponibles concernant la substance afin de limiter les essais susceptibles de provoquer des réactions sévères. Les informations suivantes peuvent être utiles pour juger s'il est approprié de pratiquer un essai complet, une étude sur un seul animal, ou de ne pas effectuer l'essai.

i) Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique. Il n'est pas nécessaire de soumettre les substances fortement acides ou alcalines (par exemple d'un pH connu inférieur ou égal à 2 ou supérieur ou égal à 11,5) à un essai d'irritation cutanée primaire si l'on suppose qu'elles ont des propriétés corrosives. Il convient de tenir également compte de la réserve alcaline ou acide.

ii) Si des essais *in vitro* correctement validés ont montré d'une manière évidente qu'une substance provoque des effets sévères, il peut être inutile d'effectuer un essai complet.

iii) Résultats d'études de toxicité aiguë. Si un essai de toxicité aiguë par administration de la substance à la dose de l'essai « limite » (2 000 mg/kg de poids corporel) par voie cutanée n'a provoqué aucune irritation de la peau, il peut être inutile de poursuivre les essais relatifs à l'irritation cutanée. Il est, en outre, inutile de soumettre à l'essai des substances qui se sont révélées très toxiques après administration par voie cutanée.

La substance à étudier est appliquée en une dose unique sur la peau de plusieurs animaux d'expérience, chaque animal étant 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 le caractère complètement réversible des effets observés.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI**1.6.1. Préparation**

Vingt-quatre heures environ avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux est tondue ou rasée.

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

Certaines souches de lapin ont des touffes de poils denses qui sont plus volumineuses à certaines périodes de l'année. Les substances d'essai ne doivent pas être appliquées sur ces régions de forte croissance pileuse.

Lorsque l'essai concerne des substances solides (qui, le cas échéant, peuvent être pulvérisées), la substance à étudier doit être suffisamment 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 doit être prise en compte lors de l'irritation de la peau par la substance à étudier. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées.

1.6.2. Conditions de l'essai**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

Si les résultats de recherches *in vitro* ou d'autres informations suggèrent que la substance peut induire une nécrose (c'est-à-dire être corrosive), il faut envisager d'effectuer l'essai sur un seul animal. Si les résultats de cet essai ne mettent pas en évidence de propriétés corrosives, l'essai doit être complété à l'aide de deux animaux supplémentaires, au moins.

Pour l'essai complet, on utilise au moins trois animaux adultes et sains. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un lot d'animaux témoins non traités. L'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux peut s'avérer nécessaire pour préciser des réponses douteuses.

1.6.2.3. Doses

Sauf contre-indications, un volume de 0,5 ml de liquide, ou 0,5 g de substance solide ou semi-solide, est appliqué sur la région de l'essai. Les zones de peau adjacentes, non traitées, de chaque animal servent de témoin.

1.6.2.4. Période d'observation

La période d'observation ne doit pas être limitée de façon rigide. Elle doit être suffisante pour évaluer totalement le caractère réversible ou non des effets observés mais il n'y a pas lieu normalement d'excéder 14 jours après l'application.

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 cm²) et recouverte d'un petit carré de gaze maintenu en place par du sparadrap non irritant. Dans le cas des liquides ou de certaines pâtes, il peut se révéler nécessaire d'étendre 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 sans serrer au contact de la peau à l'aide d'un pansement approprié occlusif ou semi-occlusif, pendant la durée de l'exposition. Il faut empêcher l'animal d'atteindre le pansement et d'ingérer/inhaler les substances d'essai.

A la fin de la période d'exposition, la substance d'essai résiduelle doit être éliminée, si possible, à l'aide d'eau ou d'un solvant approprié, sans modifier la réponse due à la substance ni l'intégrité de l'épiderme.

La durée d'exposition est normalement de quatre heures.

Si l'on craint que la substance produise une nécrose (c'est-à-dire qu'elle soit corrosive), la durée de l'exposition doit être réduite (par exemple à 1 heure ou à trois minutes). Un tel essai peut aussi être, en premier lieu, réalisé sur un seul animal et, sauf contre-indication résultant de l'essai de toxicité aiguë par administration cutanée, trois applications de substances peuvent être réalisées simultanément sur le même animal. La première est enlevée après trois minutes. S'il n'apparaît aucune réaction cutanée grave, le second pansement est enlevé au bout d'une heure. Si les observations effectuées à ce moment-là indiquent qu'une exposition de quatre heures est nécessaire et que cela est possible sans souffrance inacceptable de l'animal, le troisième pansement est enlevé après quatre heures et les réponses sont cotées. Dans ce dernier cas (c'est-à-dire quand il a été possible d'effectuer l'exposition de quatre heures), l'essai doit être complété avec deux animaux supplémentaires au moins, sauf si l'on estime que ce serait inacceptable (par exemple si une nécrose est apparue à la suite de l'exposition de quatre heures).

Si une réaction cutanée grave (par exemple une nécrose) est observée à trois minutes ou à une heure, l'essai est immédiatement interrompu.

Des expositions plus longues peuvent être indiquées sous certaines conditions, par exemple en raison des modes d'utilisation et d'exposition prévus pour l'homme.

1.6.3.1 Observations et cotations

L'observation d'érythèmes et d'oedèmes ainsi que leur cotation doivent être effectués 60 minutes, puis 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du pansement. L'irritation cutanée est cotée et enregistrée d'après le système décrit dans le tableau 1. Des observations ultérieures peuvent se révéler nécessaires si la réversibilité n'a pas été totalement établie au bout de 72 heures. Outre les observations concernant l'irritation, toute lésion grave, telle que la corrosion (destruction irréversible des tissus cutanés) et tout autre effet toxique doivent faire l'objet d'une description complète.

On peut avoir recours à des techniques comme l'examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané pour clarifier des réactions douteuses ou des réponses masquées par une coloration de la peau par la substance d'essai.

2. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal les cotations d'irritation pour l'érythème et l'oedème durant 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, la réversibilité ou la corrosion, ainsi que tout autre effet toxique observé.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes; régime alimentaire, etc.;
- conditions expérimentales (y compris les propriétés physico-chimiques pertinentes du produit, le procédé de préparation et de nettoyage de la peau et le type de pansement : occlusif ou semi-occlusif);
- tableaux des données relatives aux réactions d'irritation chez chaque animal lors de chaque observation (par exemple 1, 24, 48 et 72 heures, etc., après enlèvement du pansement);
- description de toute lésion grave observée, y compris la corrosion;
- description de l'intensité et de la nature de l'irritation observée et toute observation histopathologique;
- description de tout effet toxique autre qu'une irritation cutanée;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

Annexe

TABLEAU : NOTATION DE LA REACTION CUTANEE

	Valeur
Pas d'érythème	0
Erythème très léger (à peine perceptible)	1
Erythème bien défini	2
Erythème modéré à grave	3
Erythème grave (couleur rouge violacé) ou escarres (lésion en profondeur) qui empêche de noter l'intensité de l'érythème	4
Formation d'oedème	
Pas d'oedème	0
Oedème très léger (à peine perceptible)	1
Oedème léger (pourtour de la zone bien définie par un gonflement net)	2
Oedème modéré (gonflement du pourtour d'environ 1 mm)	3
Oedème grave (gonflement de plus d'1 mm s'étendant au-delà de la région exposée)	4

B.5. TOXICITE AIGUË (IRRITATION DES YEUX)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Considérations préliminaires

Il convient de prendre en considération toutes les informations disponibles concernant la substance afin de limiter les essais susceptibles de provoquer des réactions graves. Les informations suivantes peuvent être utiles à ce propos.

i) Propriétés physico-chimiques et réactivité chimique. Il peut ne pas être nécessaire de soumettre à un essai les substances fortement acides ou alcalines si l'on prévoit qu'elles pourraient provoquer des lésions graves, par exemple, en amenant le pH de l'oeil à une valeur inférieure ou égale à 2 ou bien supérieure ou égale à 11,5. Il convient de prendre également en considération la réserve alcaline ou acide.

ii) Résultats de méthodes alternatives correctement validées : les produits qui se sont avérés posséder des propriétés potentiellement corrosives ou très irritantes dans ces études ne devront pas être soumis à l'essai d'irritation oculaire, car il est probable que de telles substances auront des effets sévères sur l'oeil.

iii) Résultats d'études d'irritation cutanée. Les substances qui se sont clairement avérées corrosives ou très irritantes pour la peau ne doivent pas être soumises à un essai d'irritation oculaire, car il est probable qu'elles auront des effets graves sur les yeux.

La substance à étudier est appliquée en une dose unique sur l'un des deux yeux de l'animal d'expérience; l'oeil non traité sert de témoin. L'importance de la réaction d'irritation est observée et cotée à des intervalles de temps déterminés, elle fait l'objet d'une description détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'observation doit être suffisante pour permettre une évaluation du caractère totalement réversible des effets observés.

Si des animaux montrent des signes de détresse et de douleur intenses et durables, il peut être nécessaire de les euthanasier.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

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

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Bien que plusieurs espèces aient été utilisées, il est recommandé d'effectuer l'essai sur des lapins albinos adultes et sains.

1.6.2.2. Nombre d'animaux

Si l'on prévoit des effets marqués, il faut envisager d'effectuer un essai sur un seul animal. Si les résultats de ce test sur un lapin suggèrent que la substance est fortement irritante (effet réversible) ou corrosive (effet irréversible) pour l'oeil en suivant le mode opératoire décrit, il n'est pas nécessaire de poursuivre les essais d'irritation oculaire sur davantage d'animaux. Des essais supplémentaires sur un plus grand nombre d'animaux peuvent parfois être appropriés pour étudier des aspects particuliers.

Pour les tests qui portent sur plusieurs animaux, on utilisera au moins trois animaux. Il peut s'avérer nécessaire d'en utiliser un plus grand nombre pour préciser des réponses équivoques.

1.6.2.3. Doses

Si la substance à étudier est sous forme liquide, on utilise un volume de 0,1 ml. Pour les substances solides, les pâtes et les substances particulières, la quantité utilisée doit avoir un volume de 0,1 ml ou un poids de 0,1 g environ (le poids doit toujours être noté). Si la substance d'essai est solide ou sous forme de grains, 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.

Lorsque les substances sont contenues dans des vaporisateurs ou des flacons à aérosols pressurisés, il faut extraire le liquide de son récipient et en recueillir 0,1 ml que l'on instille dans l'oeil, conformément aux instructions concernant les liquides.

1.6.2.4. *Période d'observation*

La durée de la période d'observation ne doit pas être limitée de façon rigide. Sa durée doit être suffisante pour permettre une évaluation du caractère réversible ou non des effets observés mais ne doit normalement pas excéder 21 jours.

1.6.3. **Mode opératoire**

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. La substance d'essai doit être placée 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 la perte de substance. L'autre oeil, qui ne subit pas de traitement, sert de témoin.

Si l'on pense que la substance pourrait provoquer une douleur intense, on peut utiliser un anesthésique local avant de l'instiller dans l'oeil. Le type d'anesthésique local, sa concentration et son temps d'application doivent être soigneusement choisis afin de ne pas modifier de manière significative la réaction à la substance à tester. L'oeil témoin doit être anesthésié de la même manière.

Les yeux des animaux d'expérience ne doivent pas être rincés pendant les 24 heures qui suivent l'instillation de la substance à étudier. Un rinçage peut, au besoin, être effectué au bout de la vingt-quatrième heure si cela paraît approprié.

Pour certaines substances, dont le caractère irritant a été mis en évidence par cet essai, il peut être indiqué de pratiquer des essais supplémentaires en utilisant des lapins dont on rince les yeux juste après l'instillation de la substance. Il est recommandé d'utiliser trois lapins dans ce cas. Les yeux des lapins sont rincés une demi-minute après l'instillation. Le rinçage dure une demi-minute en utilisant un volume et une vitesse d'écoulement qui ne soient pas responsables d'altération de l'oeil.

1.6.3.1. *Observations et cotation*

Les yeux doivent être examinés après 1, 24, 48 et 72 heures. S'il n'y a pas de lésion oculaire au temps 72 heures, l'étude peut être terminée.

Une observation prolongée peut se révéler nécessaire en cas de persistance de l'atteinte cornéenne 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 à fente rotative, un ophthalmoscope pour animaux 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 approfondi à l'aide de fluorescéine.

2. **DONNEES**

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux indiquant, pour chaque animal, la cotation de l'intensité de l'irritation aux temps d'observation spécifiés. Il faut décrire l'intensité et la nature de l'irritation, la présence de lésions importantes ainsi que tout autre effet non-oculaire observé.

3. **RESULTATS**

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.);
- conditions expérimentales (y compris les propriétés physico-chimiques pertinentes de la substance à tester);
- tableaux des données relatives à la réaction d'irritation/corrosion chez chaque animal lors de chaque observation (par exemple 1, 24, 48 et 72 heures);
- description de toute lésion grave observée;
- description détaillée de l'intensité et de la nature de l'irritation ou de la corrosion observée, y compris la région concernée de la cornée et la réversibilité;
- description de la méthode utilisée pour évaluer l'intensité de l'irritation après 1, 24, 48 et 72 heures (par exemple lampe à fente rotative, biomicroscope, fluorescéine);
- description de tout effet local non-oculaire;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. **REFERENCES**

Voir introduction générale partie B (point E).

Annexe

TABLEAU : COTATION DES LESIONS OCULAIRES

Cornée

Opacité: degré de densité (les observations porteront sur les zones les plus denses)

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 périrnéenne modérée ou gonflement, 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 réaction à la lumière, hémorragie, destruction marquée (chacun de ces symptômes ou l'ensemble)	2

Conjonctive

Rougeur (s'applique aux observations les plus graves des conjonctives palpébrales et oculaires, par comparaison avec l'œil témoin)

Vaisseaux sanguins normaux	0
Nette hyperhémie de certains vaisseaux sanguins (yeux injectés)	1
Coloration pourpre diffuse, vaisseaux sanguins difficilement discernables individuellement	2
Coloration rouge soutenue diffuse	3

Chémosis: paupières et/ou membranes nictitantes

Pas de gonflement	0
Tout gonflement supérieur à la normale (y compris les membranes nictitantes)	1
Gonflement évident avec éversion partielle des paupières	2
Gonflement avec paupières à demi fermées	3
Gonflement avec paupières plus qu'à demi fermées	4

B.6. SENSIBILISATION CUTANEE

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Remarques :

La sensibilité des essais et leur aptitude à détecter les produits potentiellement sensibilisants cutanés pour l'homme sont des éléments considérés comme importants pour établir un système de classement de toxicité adapté en matière de santé publique.

Il n'existe pas de méthode d'essai unique qui permette d'identifier toutes les substances ayant un potentiel de sensibilisation cutanée pour l'homme.

Lors du choix d'un essai, il faut prendre en considération certains facteurs tels que les caractéristiques physiques d'une substance, et y compris son pouvoir de pénétration cutanée.

Les essais utilisant les cobayes peuvent être répartis en deux catégories : d'une part, les essais avec adjuvant, dans lesquels un état allergique est potentialisé en dissolvant ou en mettant en suspension, la substance à étudier dans l'Adjuvant Complet de Freund (ACF), et d'autre part les essais sans adjuvants.

Les essais utilisant un adjuvant permettent en général de prévoir un effet de sensibilisation cutanée d'une substance chez l'homme avec plus de précision que les méthodes qui n'utilisent pas l'Adjuvant Complet de Freund. C'est pour cette raison que leur utilisation est préférable.

L'essai de Maximalisation chez le Cobaye (EMC) est un essai de type adjuvant largement utilisé. Bien que plusieurs autres méthodes puissent être utilisées pour déceler l'aptitude d'une substance à provoquer une réaction de sensibilisation cutanée, l'EMC est considéré comme la technique employant un adjuvant à utiliser de préférence.

Les essais sans adjuvant (l'essai de Buehler est utilisé de préférence) sont considérés comme étant moins sensibles vis-à-vis d'un grand nombre de classes de produits chimiques.

Dans certains cas, il peut y avoir de bonnes raisons de choisir l'essai de Buehler qui comporte une application locale, plutôt que l'essai de Maximalisation chez le Cobaye pour lequel on pratique une injection intradermique. L'utilisation de l'essai de Buehler doit être justifiée par des raisons d'ordre scientifique.

L'essai de Maximalisation chez le Cobaye (EMC) et l'essai de Buehler sont décrits dans cette méthode. D'autres méthodes, si elles sont correctement validées, peuvent être utilisées à condition d'apporter une justification scientifique.

Quelle que soit la méthode utilisée, il convient de vérifier à intervalles réguliers (tous les six mois) que la souche de cobaye utilisée reste sensible, et qu'un sensibilisant faible à modéré connu conduit bien à un nombre satisfaisant de réponses positives.

Voir également l'introduction générale Partie B (point A).

1.2. DEFINITION

Voir introduction générale partie B (B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Les substances suivantes, diluées si nécessaire, sont recommandées, de même que toute autre substance sensibilisante citée dans la littérature ou appartenant au groupe de la substance soumise à l'essai.

— p-phénylènediamine	CAS no 106-50-3
— dinitro-2,4-chlorobenzène	CAS no 97-00-7
— dichromate de potassium	CAS no 7778-50-9
— sulfate de néomycine	CAS no 1405-10-3
— sulfate de nickel	CAS no 7786-81-4

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Après une première exposition à une substance d'essai (période d'« induction ») les animaux sont soumis, approximativement deux semaines après la dernière exposition d'induction, à une exposition de « déclenchement » à cette même substance en vue d'établir si un état d'hypersensibilité a été induit. La sensibilisation est déterminée par un examen de la réaction cutanée à l'exposition de déclenchement.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Essai de Maximalisation chez le Cobaye (EMC)

1.6.1.1. Préparation

De jeunes cobayes albinos, sains, sont répartis selon les règles du hasard en lots traités et témoins. Avant d'administrer la substance, on tond ou l'on rase la région de l'épaule en évitant d'érafler la peau.

1.6.1.2. Conditions de l'essai

1.6.1.2.1. Animaux d'expérience

On utilise des souches de laboratoire courantes de cobayes albinos; les animaux doivent peser moins de 500 g.

1.6.1.2.2. Nombre et sexe

On peut utiliser des animaux de l'un ou l'autre sexe. Si l'on utilise des femelles, celles-ci doivent être nullipares et non gravides. Un minimum de 10 animaux sont utilisés pour le lot traité et au moins 5 pour le lot témoin. Si un plus petit nombre d'animaux est utilisé, il convient d'en justifier la raison. Si les résultats ne sont pas clairs, un examen histopathologique peut aider à décider si l'essai doit être répété sur un autre lot d'animaux. Quand il n'est pas possible de conclure que la substance a ou non un pouvoir sensibilisant, il est recommandé d'ajouter des animaux supplémentaires afin d'arriver à un total d'au moins 20 animaux d'essai et 10 animaux témoins.

1.6.1.2.3. Doses

La concentration de la substance à étudier est fixée de manière à produire une irritation cutanée visible, tout en étant bien tolérée par les animaux lors de chaque phase d'induction.

La concentration de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale qui n'induit aucune irritation cutanée primaire chez des animaux non sensibilisés.

Ces concentrations peuvent être déterminées à l'aide d'une étude pilote réduite (2 ou 3 animaux).

1.6.1.2.4. Période d'observation

Durant la période d'induction, on surveille les éventuels effets irritants. Après l'exposition déclenchante, les réactions cutanées sont notées 24 et 48 heures après avoir enlevé le pansement recouvrant.

1.6.1.3. Mode opératoire

Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai. La région de l'épaule est rasée. La méthode comporte deux phases :

1.6.1.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Les injections intradermiques suivantes, chacune d'un volume de 0,1 ml, sont effectuées, par paire, dans la région de l'épaule de telle sorte que chaque injection est effectuée de chaque côté de la ligne médiane :

injection 1 : 0,1 ml d'Adjudant Complet de Freund (ACF) mélangé avec de l'eau ou une solution physiologique dans un rapport 1 :1,

injection 2 : 0,1 ml de la substance à étudier, si nécessaire dans un véhicule approprié,

injection 3 : 0,1 ml de substance à étudier dans de l'ACF.

Pour l'injection 3, les substances hydrosolubles sont dissoutes dans 0,05 ml d'eau et 0,05 ml d'ACF non dilué. Les substances liposolubles ou insolubles sont mélangées avec de l'ACF non dilué.

Pour l'injection 3, la concentration finale de la substance à étudier devra être égale à celle de l'injection 2.

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 est effectuée vers la partie caudale de la surface d'essai.

Jour 0 — lot témoin

Les injections intradermiques ci-après sont faites, par paires, aux mêmes emplacements que ci-dessus.

injection 1 : 0,1 ml d'Adjudant Complet de Freund (ACF) mélangé avec de l'eau ou une solution physiologique dans un rapport 1 :1,

injection 2 : 0,1 ml de véhicule seul,

injection 3 : 0,1 ml de véhicule dans de l'ACF.

6e jour — lot traité et lot témoin

Si la substance n'induit pas d'irritation cutanée, la zone d'essai, rasée et/ou tondue, est badigeonnée avec 0,5 ml d'une solution à 10 % de lauryl sulfate de sodium dans de la vaseline, afin de créer une irritation locale.

7e jour — lot traité

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. La substance à étudier mélangée à un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; les solides sont réduits en poudre fine et incorporés dans un véhicule approprié; au besoin, les liquides peuvent être appliqués directement) est placée sur un papier-filtre (2 x 4 cm) et appliquée sur la surface d'essai où elle est maintenue en contact avec la peau au moyen d'un pansement occlusif pendant 48 heures.

7e jour — lot témoin

La zone d'essai est à nouveau débarrassée de ses poils. Le véhicule seul est appliqué, de la même manière, sur la surface d'essai et maintenu en contact avec la peau pendant 48 heures à l'aide d'un pansement occlusif.

1.6.1.3.2. Déclenchement

21e jour

Les flancs des animaux traités et des animaux témoins sont débarrassés de leurs poils. Une petite compresse ou une cupule contenant la substance à étudier est appliquée sur l'un des flancs des animaux traités tandis qu'une petite compresse de gaze ou une cupule contenant uniquement le véhicule est appliquée sur l'autre flanc.

Les petites compresses sont maintenues en contact avec la peau à l'aide d'un pansement occlusif pendant 24 heures.

Le lot témoin est exposé d'une manière identique.

23e et 24e jours

— 21 heures après avoir enlevé la compresse, la zone de déclenchement est nettoyée et débarrassée des poils, si nécessaire,

— trois heures plus tard (soit 48 heures après le début de l'application de déclenchement) on observe et on enregistre la réaction cutanée,

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

Pour préciser les résultats obtenus lors du premier déclenchement, il y a lieu, si nécessaire, de prévoir un second déclenchement avec un nouveau lot témoin pour le véhicule, une semaine environ après le premier.

1.6.1.3.3. Observations et notations

Toutes les réactions cutanées et toutes les réactions inhabituelles résultant des phases d'induction et de déclenchement doivent être enregistrées et consignées dans le rapport.

Des techniques, comme l'examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané peuvent être utilisées pour préciser des réactions douteuses ou des réponses masquées par une coloration de la peau par la substance à étudier.

1.6.2. **Essai de Buehler**

1.6.2.1. *Préparation*

Des cobayes albinos jeunes et en bonne santé sont répartis selon les règles du hasard en lots traités et témoins. Avant d'administrer la substance, on tond et/ou on rase la région d'un des flancs des animaux en évitant d'érafler la peau.

1.6.2.2. *Conditions de l'essai*

1.6.2.2.1. Animaux d'expérience

On utilise des souches de laboratoire courantes de cobayes albinos; les animaux doivent peser moins de 500 g.

1.6.2.2.2. 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. Un minimum de 20 animaux est utilisé pour le lot traité et au moins 10 pour le lot témoin. Si un plus petit nombre d'animaux est utilisé, il convient d'en justifier la raison. Si les résultats sont douteux, un examen histopathologique peut aider à décider si l'essai doit être répété avec un autre lot d'animaux.

1.6.2.2.3. Dose

Pour chaque phase d'induction, la concentration de la substance à étudier est la concentration maximale qui peut être bien tolérée et qui, pour les substances irritantes, provoque une irritation faible à modérée chez la majorité des animaux d'expérience. La concentration de déclenchement doit correspondre à la concentration maximale qui ne produit pas d'irritation cutanée chez les animaux non sensibilisés. Ces concentrations peuvent être déterminées par une étude pilote (deux ou trois animaux).

1.6.2.2.4. Période d'observation

Durant la période d'induction, on surveille la peau des animaux afin de rechercher les effets irritants. Après l'exposition de déclenchement, les réactions cutanées sont enregistrées 24 et 48 heures après avoir enlevé la compresse recouvrant la substance à étudier, c'est-à-dire 30 et 54 heures après le début de l'application.

1.6.2.3. *Mode opératoire*

Les animaux sont pesés avant le début et à la fin de l'essai.

La méthode comporte deux phases :

1.6.2.3.1. Induction

Jour 0 — lot traité

Un des flancs est débarrassé de ses poils. Un volume de 0,5 ml de substance à étudier dans un véhicule approprié (le choix du véhicule doit être justifié; au besoin, les liquides peuvent être appliqués directement) est versé sur un tampon de coton. Celui-ci est appliqué sur la zone d'essai et maintenu en contact avec la peau au moyen d'une compresse occlusive ou d'une cupule et d'un pansement approprié pendant 6 heures.

Jour 0 — lot témoin

Un des flancs est débarrassé de ses poils. Le véhicule seul est appliqué de la même manière sur la zone d'essai. Il est maintenu en contact avec la peau par une compresse occlusive ou une cupule et un pansement approprié pendant 6 heures.

7e et 14e jour

La même application qu'au jour 0 est effectuée sur la même zone d'essai (débarrassée de ses poils si nécessaire), le 7e et le 14e jour.

1.6.2.3.2. Déclenchement

28e jour

L'autre flanc des animaux traités et témoins est débarrassé de ses poils. Une compresse occlusive ou une cupule contenant 0,5 ml de substance à étudier est appliquée, à la concentration maximale non-irritante, sur la partie postérieure du flanc des animaux traités. Une compresse occlusive ou une cupule contenant le véhicule seul est également appliquée sur le partie antérieure du flanc.

Les compresses occlusives sont maintenues au contact de la peau au moyen d'un pansement approprié pendant 6 heures.

Le groupe témoin est exposé de la même manière.

29e et 30e jours

— 21 heures après avoir enlevé la compresse, la zone de déclenchement est nettoyée et débarrassée des poils, si nécessaire,

— trois heures plus tard (soit 30 heures après le début de l'application de déclenchement) on observe et on note la réaction cutanée,

— 24 heures après cette observation (54 heures), on procède à une seconde observation que l'on note.

1.6.2.3.3. Observations et notations

Toutes les réactions cutanées et toutes les réactions inhabituelles résultant des procédés d'induction et de déclenchement doivent être notées et consignées dans le rapport.

Des techniques, comme l'examen histopathologique ou la mesure de l'épaisseur du pli cutané, peuvent être utilisées pour préciser des réactions douteuses ou des réponses masquées par une coloration de la peau par la substance à étudier.

2. DONNEES (EMC et essai de Buehler)

Les données doivent être récapitulées dans un tableau indiquant, pour chaque animal les réactions cutanées pour chaque observation.

3. RESULTATS (EMC et essai de Buehler)

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI (EMC et essai de Buehler)

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

— souche de cobayes utilisée;

— conditions expérimentales, véhicule et concentrations de la substance à étudier utilisés pour inductions et déclenchements;

— nombre, âge et sexe des animaux;

— poids de chaque animal au début et à la fin de l'essai;

— toute observation effectuée sur chaque animal, y compris le système de notation, le cas échéant;

— discussion des résultats;

— interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION (EMC et essai de Buehler)

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.7. TOXICITE À DOSES REPETEES (28 JOURS) (ORALE)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

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 des effets toxiques. Les animaux qui meurent pendant l'essai ainsi que ceux qui survivent jusqu'à la fin de l'essai sont autopsiés.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au moins pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots d'expérience. Les substances d'essai peuvent être administrées dans la nourriture, par gavage, dans des 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 et cela peut être étayé par des données publiées, si nécessaire.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce utilisée de préférence. Il faut utiliser des animaux jeunes et sains et une souche d'obtention facile au laboratoire, dans les conditions idéales, la substance doit commencer à être administrée avant que les rats n'atteignent l'âge de six semaines; ils ne doivent en aucun cas être âgés de plus de huit semaines.

Au début de l'expérience, l'intervalle de variation de poids entre les animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles) sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. 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 relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. Doses

On utilise au moins trois doses et un témoin. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Si l'on utilise un véhicule pour faciliter l'administration, ce véhicule sera administré aux témoins de la même manière qu'aux lots traités et le volume reçu correspondra à celui employé avec la dose la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation 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 de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots correspondant aux doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans le lot témoin, celle-ci devra être minime pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Lorsque la substance d'essai est administrée dans la nourriture, on peut utiliser soit une concentration alimentaire constante (ppm ou mg/kg d'aliments) 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 quantités administrées doivent être ajustées régulièrement (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver une dose constante par rapport au poids corporel de l'animal.

1.6.2.4. Essai « limite »

Si une expérience de 28 jours effectuée d'après la méthode décrite ci-dessous, à une dose unique de 1000 milligrammes par kilo de poids corporel par jour ou à une dose plus élevée, en fonction de l'exposition possible pour l'homme (lorsqu'on la connaît) ne révèle aucun effet toxique, il peut s'avérer inutile de réaliser d'autres essais. 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 signes 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

Dans les conditions idéales, la substance est administrée aux animaux 7 jours sur 7 durant une période de 28 jours. Les animaux de lots satellites prévus pour des observations de réversibilité d'effet doivent être gardés pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de déceler la régression ou la persistance des effets toxiques.

Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, ainsi que des systèmes respiratoire, circulatoire et nerveux, autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire (et la consommation d'eau lorsque la substance est administrée dans l'eau de boisson) et du poids des animaux doivent être effectués.

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 au cours de la remise en cage. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux trouvés moribonds ou dans un état de détresse ou de douleur intenses au cours de l'essai doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins) :

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales : alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo oxalo-acétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres détections éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des 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. Au moins 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. Organes et tissus (foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, coeur et tout autre organe présentant des lésions macroscopiques ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'un éventuel examen histopathologique ultérieur.

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 systématique de tous les organes et tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions induites par la substance à tester à la dose la plus élevée, devront être examinés dans tous les lots exposés à toutes les doses inférieures. Les animaux de tous les lots satellites devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux 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. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.;
- conditions de l'essai;
- doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations;
- données concernant la réponse toxique par sexe et par dose;
- dose sans effet, lorsque c'est possible;
- indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience;
- effets toxiques ou autres;
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci;
- données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel;
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets;
- examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets;
- description détaillée de toutes les observations histopathologiques;
- traitement statistique des résultats, s'il y a lieu;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.8. TOXICITE À DOSES REPETEES (28 JOURS) (INHALATION)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Il est utile de disposer d'informations préliminaires sur la distribution de la taille des particules, la pression de vapeur, le point de fusion, le point d'ébullition, le point d'éclair et l'explosivité (si applicables) de la substance.

Voir également l'introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Plusieurs lots d'animaux d'expérience sont exposés quotidiennement, pendant une période déterminée, à des concentrations croissantes de la substance à tester, une seule concentration étant utilisée par lot et ce, pendant une durée de 28 jours. Lorsqu'on utilise un véhicule en vue d'obtenir une concentration adéquate 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 qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au moins pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots requis. Au besoin un véhicule approprié peut être utilisé pour obtenir une concentration adéquate de substance dans l'atmosphère. Si l'on utilise un véhicule ou un autre additif pour faciliter l'administration, celui-ci doit être réputé non toxique et cela peut être étayé par des données publiées, si nécessaire.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

Sauf contre-indication, le rat est l'espèce utilisée de préférence. Il faut utiliser des animaux jeunes et sains d'une souche courante d'animaux de laboratoire.

Au début de l'expérience, l'intervalle de variation de poids entre les animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles) sont utilisés pour chaque lot. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. 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 relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. Concentration d'exposition

On utilise au moins trois concentrations ainsi qu'un témoin ou un lot témoin pour le véhicule (correspondant à la concentration de véhicule présente dans l'atmosphère inhalé par le groupe de traitement le plus élevé). Excepté l'exposition à la substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les sujets des lots d'expérience. La concentration la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La concentration la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation 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, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots à concentrations faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minimale pour que l'évaluation des résultats soit valable.

1.6.2.4. Durée d'exposition

L'exposition quotidienne doit être de 6 heures, mais d'autres durées peuvent se révéler nécessaires pour répondre à certaines exigences particulières.

1.6.2.5. Dispositif expérimental

Les animaux doivent être exposés à la substance d'essai au moyen d'un dispositif d'exposition dynamique capable de maintenir un flux d'air continu permettant au moins 12 renouvellements de l'atmosphère de l'enceinte d'exposition par heure, et assurant une teneur en oxygène suffisante et une répartition uniforme du produit à tester dans l'air. Si l'on utilise une chambre d'exposition, celle-ci doit être conçue de manière à éviter autant que possible l'entassement des animaux et à optimiser l'exposition 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 soit oro-nasal, soit de la tête seule, soit du corps entier en chambre individuelle; les deux premiers types d'exposition présentent l'avantage de limiter la pénétration de la substance d'essai 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 notés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux sont quotidiennement exposés à la substance à tester à raison de 5 à 7 jours par semaine pendant une période de 28 jours. Les animaux de tout groupe satellite destiné à des observations de réversibilité d'effet doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de déceler la régression ou la persistance des effets toxiques. La température à laquelle s'effectue l'essai doit être maintenue à $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dans les conditions idéales, l'humidité relative doit être maintenue entre 30 et 70 % mais, dans certains cas, cela peut se révéler impossible (par exemple, essai de certains aérosols). Le maintien d'une pression légèrement négative à l'intérieur de la chambre ($\leq 5 \text{ mm d'eau}$) empêchera la fuite de substance d'essai vers l'extérieur. La nourriture et l'eau doivent être retirées pendant l'exposition.

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 établir les concentrations d'exposition appropriées, il est recommandé de procéder à un essai préliminaire. Le débit devra être réglé ajusté pour assurer des concentrations homogènes dans toute la chambre. Le système doit permettre d'obtenir des conditions d'exposition stables aussi rapidement que possible.

Il y a lieu de mesurer ou de contrôler : a) le débit (en permanence).

b) la concentration réelle de la substance d'essai. Elle doit être mesurée dans la zone de respiration; pendant la période d'exposition quotidienne, la concentration ne doit pas varier de plus de $\pm 15 \%$ par rapport à la valeur moyenne. Toutefois, dans le cas de certains aérosols, ce degré de contrôle peut ne pas être obtenu et un écart plus grand est alors acceptable. Durant toute la durée de l'étude, il faut garder les concentrations aussi constantes que possible d'un jour à l'autre. En ce qui concerne les aérosols, la taille des particules doit être analysée au moins une fois par semaine pour chaque groupe d'exposition.

c) la température et l'humidité, en permanence si possible.

Les observations ont lieu pendant et après l'exposition et sont notées systématiquement; une fiche individuelle doit être établie pour chaque animal. Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité, y compris leur moment d'apparition, leur intensité et leur durée doivent être enregistrés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Les animaux sont pesés toutes les semaines. Il est aussi recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire. 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 au cours des remises en cage. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants, appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux trouvés moribonds ou dans un état de détresse ou de douleur intenses au cours de l'essai doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins) :

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales : alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique) aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo oxalo-acétique), urée, albumine, créatinine, 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, la glycémie à jeun, l'analyse des lipides, les hormones, l'équilibre acido-basique, la méthémoglobine et 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 macroscopique. Au moins le foie, les reins, les glandes surrénales, les poumons et les testicules doivent être pesés à l'état humide le plus rapidement possible après la dissection afin d'éviter le dessèchement. Organes et tissus (système respiratoire, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, coeur et tout autre organe présentant des lésions macroscopiques ou des modifications de leur volume) doivent être conservés dans un milieu approprié en vue d'éventuels examens histopathologiques ultérieurs. Les poumons doivent être prélevés entiers, pesés et traités au moyen d'un fixateur approprié permettant de conserver la structure pulmonaire intacte.

1.6.3.2. Examen histopathologique

Pour le lot exposé à la dose la plus élevée et le(s) lot(s) témoin(s), il faut pratiquer un examen histologique systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions induites par la substance à tester au niveau à la dose la plus élevée, devront être examinés dans tous les lots exposés à toutes les doses inférieures. Les animaux de tout lot satellite devront 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. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux 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. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le proces-verbal d'essai contiendra, si possible, les renseignements suivants :

— espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire etc;

— conditions de l'essai :

Description du dispositif d'inhalation, y compris conception, type, dimensions, source d'air, système de génération d'aérosols, méthode de conditionnement d'air, traitement de l'atmosphère rejetée hors de l'enceinte et, le cas échéant, modalités d'hébergement des animaux en chambre d'essai. L'équipement de mesure de température, d'humidité et, s'il y a lieu, de la stabilité des concentrations des aérosols ou de la distribution de taille des particules doit être décrit.

Données relatives à l'exposition :

elles doivent être représentées sous la forme de tableaux indiquant des valeurs moyennes ainsi qu'une mesure de la variabilité (par exemple, écart type); elles doivent, si possible, inclure :

- a) les débits d'air dans 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) le diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) et l'écart-type géométrique (ETG) :
 - données concernant la réponse toxique par sexe et par concentration;
 - moment de la mort en cours d'expérience ou indication que les animaux ont survécu à l'expérience;
 - description des effets toxiques ou autres; concentration sans effet;
 - moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci;
 - données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel;
 - examens hématologiques pratiqués et résultats complets;
 - examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets;
 - résultats d'autopsie;
 - description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
 - traitement statistique des résultats, si possible;
 - discussion des résultats;
 - interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.9. TOXICITE A DOSES REPETEES (28 JOURS) (ADMINISTRATION CUTANEE)

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point B).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

La substance à tester est appliquée quotidiennement, à doses croissantes, sur la peau de plusieurs lots d'animaux d'expérience pendant une période déterminée, à raison d'une seule dose par lot, pendant une durée de 28 jours. Durant la période d'application, les animaux sont observés quotidiennement afin de déceler les signes de toxicité. Les animaux qui meurent en cours d'expérience ainsi que ceux qui sont encore en vie à l'issue de l'expérience sont autopsiés.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

1.6.1. Préparation

Les animaux sont maintenus dans des conditions d'hébergement et d'alimentation propres à l'expérience au minimum pendant les 5 jours qui la précèdent. Avant l'expérience, des animaux jeunes et sains sont répartis selon les règles du hasard entre les différents lots témoins et traités. Peu de temps avant l'essai, on tond la région dorsale du tronc des animaux. On peut avoir recours au rasage mais, dans ce cas, l'opération doit être effectuée 24 heures environ avant l'essai. Il est en général nécessaire de répéter les opérations de tonte ou de rasage à des intervalles d'une semaine environ, en évitant toute lésion de la peau. La surface à préparer pour l'application de la substance ne doit pas être inférieure à 10 % de la surface corporelle. Le poids de l'animal doit être pris en considération pour décider de la taille

de la zone à épiler, et de la dimension de la surface à traiter. 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. Les substances liquides sont généralement appliquées non diluées. On procède à une application quotidienne à raison de 5 à 7 jours par semaine.

1.6.2. Conditions de l'essai

1.6.2.1. Animaux d'expérience

On peut utiliser des rats, des lapins ou des cobayes adultes. On peut également utiliser d'autres espèces, mais il faut dans ce cas en justifier l'utilisation.

Au début de l'essai, l'intervalle de variation du poids des animaux utilisés ne doit pas excéder $\pm 20\%$ de la valeur moyenne requise.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Dix animaux au moins (cinq femelles et cinq mâles), à la peau saine, sont utilisés pour chaque dose. Les femelles doivent être nullipares et non-gravidés. S'il est prévu dans le protocole expérimental des sacrifices intermédiaires en cours d'expérience, il y a lieu d'ajouter la quantité d'animaux nécessaire pour ces sacrifices. 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 relative à la réversibilité, la persistance ou l'apparition tardive d'effets toxiques durant les 14 jours qui suivent l'arrêt du traitement. On utilise aussi un lot satellite témoin de 10 animaux (cinq animaux par sexe).

1.6.2.3. Doses

On utilise au moins trois doses ainsi qu'un lot témoin ou, le cas échéant, un lot témoin traité avec le véhicule. La période d'exposition devra être d'au moins 6 heures par jour. La substance à tester doit être appliquée chaque jour au même moment et les quantités à administrer doivent faire l'objet d'une adaptation régulière (hebdomadaire ou bihebdomadaire) afin de conserver un niveau de dose constant par rapport au poids corporel des animaux. Excepté l'administration de substance d'essai, les animaux du lot témoin doivent être traités de la même manière que les animaux des lots d'expérience. Lorsqu'un véhicule est utilisé pour faciliter l'administration, celui-ci sera administré au lot témoin dans les mêmes conditions qu'aux lots traités et la quantité de véhicule correspondra à celle reçue par le groupe traité avec la dose de substance d'essai la plus élevée. La dose la plus élevée doit être suffisamment forte pour produire des effets toxiques mais sans toutefois entraîner la mort (ou rarement). La dose la plus faible ne doit faire apparaître aucun effet toxique. Lorsque l'on dispose d'une estimation concernant l'exposition de l'homme, la dose 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, celles-ci doivent être espacées de façon à entraîner une gradation des effets toxiques. En cas de mortalité dans les lots recevant les doses faibles et intermédiaires, ainsi que dans les lots témoins, celle-ci devra être minime pour que l'évaluation des résultats soit valable.

Si l'application de la substance d'essai provoque une irritation cutanée grave, les concentrations doivent être réduites, ce qui 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 recommencer avec des concentrations plus faibles.

1.6.2.4. Essai « limite »

Si une expérience préliminaire réalisée avec une dose de 1 000 mg/kg de poids corporel ou avec une dose plus élevée en fonction de l'exposition possible pour l'homme, n'a provoqué aucun effet toxique, il peut s'avérer 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 d'intoxication. Le moment où les symptômes d'intoxication apparaissent et disparaissent ainsi que le moment de la mort doivent être consignés.

1.6.3. Mode opératoire

Les animaux doivent être placés dans des cages individuelles. Dans les conditions idéales, la substance d'essai est administrée aux animaux 7 jours sur 7, pendant une période de 28 jours. Les animaux de tous les lots satellites destinés à des observations complémentaires doivent être gardés en vie pendant 14 jours encore, sans traitement, afin de constater la régression 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 corporelle totale mais lorsqu'il s'agit de substances hautement toxiques, la surface couverte peut être réduite. La couche de substance doit être aussi mince et uniforme que possible.

Durant l'exposition, la substance d'essai est maintenue en contact avec la peau au moyen d'une compresse de gaze poreuse 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 de manière à éviter que les animaux puissent ingérer la substance à tester. Des appareils de contention peuvent être utilisés pour empêcher l'ingestion de la substance mais une immobilisation complète n'est pas recommandée. Il est également possible d'utiliser la technique du « collier de protection ».

A l'issue de la période d'exposition, il faut, si possible, éliminer la substance résiduelle avec de l'eau ou par tout autre procédé adéquat de nettoyage de la peau.

Tous les animaux doivent être observés quotidiennement et les signes de toxicité ainsi que le moment de leur apparition, leur intensité et leur durée doivent être notés. Les observations doivent concerner les modifications de la peau et des poils, des yeux, des muqueuses, de l'appareil respiratoire, du système circulatoire ainsi que des systèmes nerveux autonome et central, de l'activité somato-motrice et du comportement. Les animaux doivent être pesés chaque semaine. Il est également recommandé d'effectuer des mesures hebdomadaires sur la consommation alimentaire des animaux. 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 au cours des remises en cages. A l'issue de l'expérience, tous les animaux survivants appartenant aux lots traités, non satellites, sont autopsiés. Les animaux moribonds et les animaux dans un état de détresse ou de douleur intenses doivent être immédiatement retirés, euthanasiés et autopsiés.

Les examens figurant ci-après seront effectués à l'issue de la période d'essai sur tous les animaux (y compris les témoins) :

1. examen hématologique comprenant au moins l'hématocrite, la concentration en hémoglobine, le dénombrement des érythrocytes et des leucocytes, la formule leucocytaire ainsi qu'une étude de la coagulation;

2. examen biochimique clinique du sang comprenant au moins un paramètre des fonctions hépatiques et rénales : alanine aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamopyruvique), aspartate aminotransférase sérique (anciennement connue sous le nom de transaminase glutamo oxalo- acétique), urée, albumine, créatinine, bilirubine totale et protéines sériques totales.

D'autres déterminations éventuellement nécessaires à une évaluation toxicologique adéquate concernent le calcium, le phosphore, les chlorures, le sodium, le potassium, la glycémie à jeun, l'analyse des 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 macroscopique. Au moins 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. Organes et tissus, à savoir, peau normale et traitée, foie, reins, rate, testicules, glandes surrénales, coeur et les organes-cibles (c'est-à-dire ceux qui présentent des lésions importantes ou des modifications de leur volume) 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 systématique de tous les organes et des tissus conservés. Les organes et tissus qui auront présenté des lésions attribuables à la substance à tester à la dose la plus élevée devront être examinés dans tous les lots ayant été exposés à des doses plus faibles. Les animaux de tout lot satellite devront faire l'objet d'un examen histologique particulièrement axé sur les organes et les tissus pour lesquels les lésions ont été constatées dans les lots traités.

2. DONNEES

Les données doivent être récapitulées sous forme de tableaux 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. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- données concernant les animaux (espèce, souche, origine, conditions ambiantes, régime alimentaire, etc.);
- conditions de l'essai, (y compris le type de pansement : occlusif ou non-occlusif);
- doses (avec, le cas échéant, le véhicule) et concentrations;
- dose sans effet, lorsque c'est possible;
- données relatives à la réponse toxique par sexe et par dose;
- indication du moment de la mort en cours d'expérience ou des survies au terme de l'expérience;
- effets toxiques ou autres;
- moment de l'observation de tout symptôme anormal et évolution de celui-ci;
- données relatives à la prise de nourriture et à l'évolution du poids corporel;
- examens hématologiques pratiqués et résultats complets;
- examens biochimiques cliniques pratiqués et résultats complets;
 - résultats d'autopsie;
- description détaillée de tous les résultats histopathologiques;
- traitement statistique des résultats, si possible;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.10. ESSAI DE CYTOGENETIQUE « IN VITRO » SUR MAMMIFERE**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point C).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

L'essai de cytogénétique *in vitro* est un essai de mutagénicité à court terme destiné à déceler des aberrations chromosomiques structurales dans des cellules mammifères en culture. Des cultures de lignées cellulaires établies ainsi que des cultures de cellules primaires peuvent être utilisées. Après exposition aux produits chimiques à tester, en présence et en absence d'un système d'activation métabolique approprié, les cultures cellulaires sont traitées par des inhibiteurs du fuseau mitotique, comme la colchicine afin de bloquer les cellules dans une phase de la mitose de type métaphase (c-métaphase). Les cellules sont récoltées à des moments adéquats et des préparations de chromosomes sont effectuées. Ces dernières sont colorées et les anomalies chromosomiques sont recherchées dans les cellules en métaphase.

1.5. CRITERE DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI**1.6.1. Préparations****1.6.1.1. Cellules**

On utilise des lignées cellulaires établies ou des cultures de cellules primaires, par exemple des cellules de hamster chinois ou des lymphocytes humains. Les produits chimiques à étudier sont préparés dans un milieu de culture ou dissous dans des véhicules appropriés avant le traitement des cellules.

1.6.1.2. Système d'activation métabolique

Des cellules doivent être exposées à la substance à étudier à la fois en présence et en l'absence d'un système d'activation métabolique approprié. Le système le plus couramment utilisé est la fraction postmitochondriale enrichie en cofacteurs, préparée à partir de foie de rongeurs traités avec des agents inducteurs enzymatiques.

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 métabolique est employé, une substance dont on sait qu'elle nécessite une activation métabolique est utilisée comme témoin positif.

Concentration :

On utilise au moins 3 concentrations de la substance à étudier sur un intervalle d'un logarithme au moins. La concentration la plus élevée doit réduire l'activité mitotique d'environ 50 % ou présenter un autre signe de cytotoxicité. Si la substance à étudier n'est pas toxique, il convient de pratiquer des essais jusqu'à la limite de solubilité ou jusqu'à une concentration maximale de 5 mg/ml.

Conditions de culture :

Un milieu de culture et des conditions d'incubation (par exemple, température, flacon de culture, concentration 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 trypsinisation ou par agitation vigoureuse), ensemencées dans des flacons de culture à une densité adéquate et incubées à 37 °C.

Lymphocytes humains : le sang total hépariné est ajouté au milieu de culture contenant de la phytohémagglutinine, du sérum de veau foetal et des antibiotiques, puis incubé à 37 °C.

1.6.3.2. Traitement des cultures avec la substance à étudier**(i) traitement sans mélange d'activation métabolique hépatique**

Tous les traitements doivent, si possible, couvrir au moins la durée d'un cycle cellulaire complet, et les schémas de fixation doivent garantir l'analyse des cellules de première mitose après le traitement à différents stades du cycle.

Lorsque le traitement ne couvre pas la durée d'un cycle cellulaire complet, on choisit des temps de fixation de manière à prélever des échantillons de cellules qui se trouvaient à différents stades du cycle au moment du traitement, c'est-à-dire en phase G₁, S et G₂.

Le produit à tester est ajouté aux cultures de lignées cellulaires établies lorsque celles-ci se trouvent en phase de croissance exponentielle. Les cultures de lymphocytes humains sont traitées alors qu'elles sont dans un état semi-synchrone.

(ii) Traitement avec le mélange d'activation métabolique hépatique

Le mélange substance à étudier-système d'activation 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 permettant de prélever des cellules qui se trouvaient à des stades différents du cycle cellulaire au moment du traitement, c'est-à-dire en phase G₁, S et G₂.

Récolte des cellules

Les cultures cellulaires sont traitées avec un inhibiteur du fuseau mitotique pendant une période appropriée avant leur récolte. Chaque culture est récoltée et traitée séparément pour la préparation des chromosomes.

Il faut au moins deux temps de récolte, et il est conseillé d'en choisir un correspondant à la fin du premier cycle cellulaire et un autre plus tard. On est sûr de couvrir ainsi tous les stades du cycle cellulaire et on tient compte du retard du cycle cellulaire.

1.6.3.3. *Préparation des chromosomes*

Les préparations de chromosomes comportent : traitement hypotonique des cellules, fixation, étalement sur lames et coloration.

Analyse :

Pour chaque culture, au moins 100 métaphases correctement étalées sont analysées pour déceler les aberrations chromosomiques. Les lames sont codées avant l'analyse. Pour les lymphocytes humains, seules les métaphases contenant 46 centromères sont analysées.

Pour les lignées cellulaires continues, seules les métaphases contenant le nombre modal de centromères ± 2 sont analysées.

De plus, l'indice mitotique ou un autre signe de cytotoxicité, s'il y a lieu, doit être estimé au cours de l'essai, pour chaque concentration.

2. DONNEES

Les données sont présentées sous forme de tableau. Les aberrations de type chromatidien (lacunes, cassures, échanges), les aberrations de type chromosomique (par exemple lacunes, cassures, minutes, anneaux, dicentriques, polycentriques) ainsi que le nombre de métaphases anormales (lacunes comprises et exclues) sont notées séparément pour toutes les cultures traitées et témoins.

Les données sont évaluées à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Les résultats des essais doivent être comparés avec les témoins négatifs effectués parallèlement.

Au moins deux expériences indépendantes sont réalisées. Toutefois, une seule expérience peut être suffisante, à condition de pouvoir le justifier scientifiquement. Il n'est pas nécessaire d'effectuer la seconde expérience de la même manière que la première. Il peut même être préférable de modifier certains paramètres de l'essai afin d'obtenir davantage de données utiles.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai contiendra, si possible, 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 du 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);
- indice mitotique ou autre signe de cytotoxicité;
- type et nombre d'aberrations indiquées 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. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

**B.11. ESSAI DE CYTOGENETIQUE IN VIVO SUR LA MOELLE OSSEUSE DE MAMMIFERE
ANALYSE CHROMOSOMIQUE**

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point C).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

L'essai de cytogénétique *in vivo* est un essai de mutagénicité à court terme destiné à déceler les aberrations chromosomiques structurales. Celles-ci sont généralement évaluées au cours de la première mitose consécutive au traitement. Avec les agents mutagènes chimiques, la plupart des aberrations induites sont de type chromatidien.

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 avec un inhibiteur de la formation du fuseau, tel que la colchicine, afin de bloquer les cellules en phase mitotique de type métaphase (c-métaphase). A partir de ces cellules, des préparations de chromosomes sont effectuées, séchées à l'air, puis colorées; les métaphases sont ensuite analysées au microscope afin de déceler les aberrations chromosomiques.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Néant

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Préparations

Les produits à étudier sont dissous 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 l'administration, 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

On utilise des rongeurs tels que le rat, la souris ou le hamster chinois. Des animaux adultes, jeunes et sains, sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Au moins cinq femelles et cinq mâles sont utilisés pour chaque lot expérimental et chaque lot témoin. Dix animaux seront donc sacrifiés par intervalle de temps et par lot, si le protocole expérimental comporte plusieurs temps de récolte après le traitement.

Pour le lot témoin positif, un seul temps suffit.

1.6.2.3. Voie d'administration

En général, les substances à étudier doivent être administrées en une seule fois. En fonction des informations toxicologiques dont on dispose, un schéma d'administration répétée peut être utilisé. Toutefois, il ne peut l'être que si la substance 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 connue pour produire des aberrations chromosomiques *in vivo* est utilisée comme témoin positif et un lot témoin négatif (solvant) est généralement inclus dans le schéma 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 des signes de cytotoxicité (par exemple une inhibition partielle de mitoses).

Pour les substances « non toxiques », la dose maximale (limite) à étudier est la dose unique de 2 000 mg/kg de poids corporel.

Si l'on suit un schéma d'administration répétée, la dose limite est de 1000 mg/kg de poids corporel par jour.

Des doses supplémentaires peuvent être utilisées lorsqu'elles sont indiquées pour des raisons scientifiques.

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 est administrée une fois aux animaux, à la dose maximale tolérée. Dans un premier temps, des échantillons sont prélevés 24 heures après le traitement. Si, à ce stade, les résultats sont clairement positifs il peut être inutile de poursuivre l'essai. Par contre, si les résultats sont négatifs ou douteux, il y a lieu d'effectuer un prélèvement antérieur et un prélèvement postérieur, à intervalles appropriés, dans l'intervalle de 6 à 48 heures suivant l'administration, puisque la cinétique du cycle cellulaire peut être influencée par la substance d'essai.

Lorsque des doses supplémentaires sont utilisées, il faut 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, une administration répétée peut être utilisée; 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'un inhibiteur du fuseau 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 récemment 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 correctement étalées comportant le nombre complet de centromères sont analysées par animal en vue de déceler les aberrations chromosomiques structurales. En outre, les indices mitotiques peuvent être établis pour chaque animal.

2. DONNEES

Les données sont présentées sous forme de tableau. Les aberrations de type chromatidien, et de type isochromatidien (lacunes, cassures, échanges) ainsi que les indices mitotiques, lorsqu'ils sont établis, sont consignés séparément pour toutes les cultures traitées et témoins. Les valeurs moyennes et les écarts types sont également enregistrés pour chaque lot expérimental et chaque lot témoin. Les données sont évaluées à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche et âge des animaux utilisés;
- nombre d'animaux de chaque sexe dans les lots traités et les lots témoins;
- conditions expérimentales : description détaillée du programme de traitement et de prélèvement, doses, durée du traitement avec l'inhibiteur du fuseau et concentration de celui-ci;
- nombre de métaphases analysées par animal;
- indices mitotiques, lorsqu'ils sont établis;
- type et nombre d'aberrations indiquées séparément pour chaque animal traité et témoin;
- signes d'intoxication au cours de l'étude;
- évaluation statistique;

- discussion des résultats;
 - interprétation des résultats.
- 3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION
Voir introduction générale partie B (point D).
4. REFERENCES
Voir introduction générale partie B (point E).

B.12. ESSAI DU MICRONOYAU

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point C).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

L'essai du micronoyau est un essai *in vivo* à court terme sur mammifère destiné à déceler des lésions chromosomiques ou de l'appareil mitotique induites par des substances chimiques. Cet essai est basé sur une augmentation du nombre de micronoyaux dans les érythrocytes polychromatophiles des animaux traités par rapport aux animaux témoins.

Les micronoyaux sont formés de fragments de chromosomes ou de chromosomes entiers perdus lors de la mitose. Lorsque les érythroblastes se transforment en érythrocytes, le noyau principal est expulsé tandis que le micronoyau peut rester dans le cytoplasme. Pour cet essai, on utilise des érythrocytes polychromatophiles jeunes provenant de la moelle osseuse de mammifères de laboratoire ayant été exposés, par des voies appropriées, à la substance 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 polychromatophiles et on établit le rapport entre érythrocytes polychromatophiles et normophiles.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Préparation

Les produits chimiques à étudier sont dissous 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 pas interférer avec la substance à étudier ni produire des effets toxiques. Normalement, des solutions de la substance d'essai fraîchement préparées sont utilisées.

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. Des animaux adultes, jeunes et sains sont répartis au hasard en lots traités et lots témoins.

1.6.2.2. Nombre et sexe

Au moins cinq femelles et cinq mâles sont utilisés pour chaque lot expérimental et chaque lot témoin. Dix animaux seront donc sacrifiés par temps et par lot, si le protocole expérimental comporte plusieurs temps de prélèvement après le traitement. Pour le groupe témoin positif, un seul temps de prélèvement suffit.

1.6.2.3. Voie d'administration

En général, les substances à étudier 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 à étudier 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 (solvants) 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 entre érythrocytes polychromatophiles et érythrocytes normophiles.

Pour les substances « non-toxiques », la dose maximale (limite) à étudier par administration d'une dose unique est de 2 000 mg/kg de poids corporel.

Si l'on suit un programme d'administration répétée, la dose limite est de 1 000 mg/kg de poids corporel par jour. D'autres doses peuvent être utilisées lorsqu'elles sont indiquées pour des raisons scientifiques.

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 est administrée en une seule fois aux animaux. Les prélèvements d'échantillons doivent être effectués au moment correspondant à la réponse maximale de l'essai qui varie selon la substance d'essai. C'est pourquoi les prélèvements de moelle osseuse sont effectués à deux reprises au moins, au moins 12 heures après le traitement sans aller au-delà de 48 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 des informations pharmaco-cinétiques et métaboliques nécessitent un schéma de traitement répété, une administration répétée peut être employée et les échantillons doivent être prélevés une fois, au moins 12 heures après le dernier traitement.

Préparation de la moelle osseuse

La moelle osseuse est prélevée dans les deux fémurs d'animaux récemment sacrifiés, par rinçage, à l'aide de sérum de veau fœtal. Les cellules sont centrifugées et le surnageant est éliminé. Des gouttes de la suspension cellulaire homogènes 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 dans au moins 1 000 érythrocytes polychromatophiles par animal.

Le rapport entre érythrocytes normophiles et polychromatophiles est déterminé, pour chaque animal, par comptage d'un nombre total de 1 000 érythrocytes.

2. DONNEES

Les données sont présentées sous forme de tableau. Le nombre d'érythrocytes polychromatophiles, le nombre d'érythrocytes polychromatophiles comportant des micronoyaux ainsi que le pourcentage de cellules micronuclées sont enregistrés séparément pour chaque animal traité et chaque animal témoin ainsi que le rapport entre érythrocytes normophiles et polychromatophiles. Les moyennes et les écart-types sont également consignées pour chaque lot expérimental et chaque lot témoin. Les données sont évaluées à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- espèce, souche et âge des animaux utilisés;
- nombre d'animaux de chaque sexe dans les lots traités et les lots témoins;
- conditions expérimentales : description détaillée du programme de traitement et de prélèvement, doses, données relatives à la toxicité, témoins négatifs et positifs;
- critères de dénombrement des micronoyaux;
- relation dose-effet, si possible;
- évaluation statistique;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.13. ESSAI DE MUTATION REVERSE SUR ESCHERICHIA COLI

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point C).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Néant.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

Le système de réversion du tryptophane (trp) d'*Escherichia Coli* est un essai microbien permettant de mesurer la réversion trp- — trp+ due à des substances chimiques responsables de substitutions de bases au niveau du génome bactérien.

Les bactéries sont exposées aux substances d'essai avec ou sans activation métabolique. Après une période d'incubation adéquate sur milieu minimal, 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. CRITERES DE QUALITE

Néant.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

L'essai peut être réalisé par les méthodes suivantes : 1) la méthode de préincubation et 2) la méthode d'incorporation directe où les bactéries et la substance d'essai sont mélangées à la gélose de surface et réparties à la surface d'une boîte de gélose sélective.

1.6.1. Préparation

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 10^8 - 10^9 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. Le système le plus fréquemment utilisé est la fraction post-mitochondriale suppléée de cofacteurs préparée à partir de foie de rongeurs traités avec des inducteurs enzymatiques.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Souches bactériennes

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 mytomycine C ainsi que la résistance à l'ampicilline dans le cas de la souche WP2 uvr A pKM 101 doivent être vérifiées. Les souches doivent également produire des révertants 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 surface 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 réalisés dans les deux buts suivants :

i) confirmer la sensibilité des souches bactériennes.

Le méthanesulfonate de méthyl, l'oxyde de nitro-4-quinoléine ou l'éthylnitrosourée peuvent être utilisés comme témoins positifs pour les essais sans activation métabolique,

ii) garantir l'activité du système métabolisant adéquat.

L'amino-2-anthracène constitue un témoin positif de l'activité 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 boîte

Au moins cinq quantités différentes de la substance à tester doivent être soumises à l'essai avec des écarts semi-logarithmiques entre les doses. Les substances sont testées jusqu'aux limites de solubilité ou de toxicité. La toxicité est mise en évidence par une réduction du nombre de révertants spontanés, un éclaircissement du tapis bactérien, ou par le taux de survie des cultures traitées. Les substances chimiques non toxiques doivent être testées jusqu'à cinq milligrammes par boîte avant que l'on puisse considérer la substance 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, la substance à tester est ajoutée à 0,1 millilitre de culture bactérienne fraîche et à 2,0 millilitres de gélose de surface. Pour les essais avec activation métabolique, on ajoute à la gélose de surface 0,5 millilitre de mélange d'activation d'enzymes hépatiques contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriale, 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 surface doit se solidifier et les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 48 à 72 heures. Au terme de la période d'incubation, les colonies révertantes par boîte sont dénombrées.

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 métabolique hépatiques, ou la même quantité de solution tampon, est préincubé avant addition de 2,0 millilitres de gélose de surface. 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. DONNEES

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.

Les données doivent être évaluées à l'aide de méthodes statistiques adéquates.

Au moins deux expériences indépendantes sont réalisées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer la seconde de la même manière que la première. Il peut même être préférable de modifier certaines conditions expérimentales afin d'obtenir davantage de données utiles.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

— bactéries, souche utilisée.

— conditions expérimentales : doses, toxicité, composition des milieux, méthodes de traitement (préincubation, incubation), système d'activation métabolique, substances de référence, témoins négatifs.

— comptage par boîte, nombre moyen de colonies révertantes par boîte, écart-type, relation effet/dose si possible.

— discussion des résultats.

— interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

B.14. ESSAI DE MUTATION REVERSE SUR SALMONELLA TYPHIMURIUM

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Voir introduction générale, partie B (point A).

1.2. DEFINITIONS

Voir introduction générale partie B (point C).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Aucune.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

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 bactérien.

Les bactéries sont exposées aux substances d'essai avec et sans activation métabolique et réparties sur la surface d'un milieu minimal. Après une période d'incubation adéquate, on dénombre les colonies révertantes et on compare au nombre de révertants spontanés observés dans une culture témoin non traitée et/ou en présence du solvant.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Aucun.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Préparation

1.6.1.1. Bactéries

Les cultures fraîches de bactéries sont incubées 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 à 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 métabolique adéquat. Le système le plus fréquemment utilisé est une fraction post-mitochondriale enrichie en cofacteurs, préparée à partir de foie de rongeurs traités avec des inducteurs enzymatiques.

1.6.2. Conditions expérimentales

1.6.2.1. Souches bactériennes

Au moins quatre souches, à savoir TA 1535, TA 1537 ou TA 97, TA 98 et TA 100, doivent être utilisées. D'autres souches, telles que TA 1538 et TA 102 peuvent être utilisées en supplément. Il y a lieu d'utiliser des méthodes reconnues pour la préparation et la conservation des cultures de départ. Les exigences de 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 attendues.

1.6.2.2. Milieux

On utilise un milieu sélectif approprié ainsi qu'une gélose de surface 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 du solvant. Des témoins positifs doivent également être réalisés dans les deux buts suivants :

i) confirmer la sensibilité des souches bactériennes.

Les composés suivants peuvent être utilisés pour les essais sans activation métabolique :

Souche :

TA 1535, TA 100

TA 1538, TA 98, TA 97

TA 1537

TA 102

Réversion avec :

Azide de sodium

Nitro-2-fluorène

Amino-9-acridine

Hydroperoxide de cumène

ii) garantir l'activité du système de métabolisation adéquat.

L' amino-2-anthracène constitue un témoin positif de l'activité du système pour toutes les souches. Il convient, s'il en existe, 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 boîte

Au moins cinq quantités différentes de la substance doivent être soumises à l'essai avec des écarts semi-logarithmiques entre les doses. Les substances sont testées jusqu'à la limite de solubilité ou de toxicité. La toxicité est mise en évidence par une réduction du nombre de révertants spontanés, un éclaircissement du tapis bactérien, ou par le taux de survie des cultures traitées. Les substances chimiques non toxiques doivent être testées jusqu'à cinq milligrammes par boîte avant que l'on puisse les considérer comme négatives.

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 métabolique, on ajoute la substance à tester et 0,1 millilitres de culture bactérienne fraîche à 2,0 millilitres de gélose de surface. Pour les essais avec activation métabolique, on ajoute à la gélose de recouvrement 0,5 millilitre de mélange d'activation d'enzymes hépatiques contenant une quantité adéquate de fraction post-mitochondriale, 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. On laisse la gélose de surface 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 avec 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 est préincubé 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. DONNEES

Le nombre de colonies révertantes par boîte, est indiqué pour les séries témoins et les séries traitées.

Le nombre de colonies pour chaque boîte, le nombre moyen de colonies révertantes par boîte et les écarts-types doivent être indiqués pour la substance testée et les témoins.

Les données doivent être évaluées à l'aide de méthodes statistiques adéquates.

Au moins deux expériences indépendantes sont réalisées. Il n'est pas nécessaire d'effectuer la seconde de la même manière que la première. Il peut même être préférable de modifier certaines conditions expérimentales afin d'obtenir des données plus utiles.

3. RESULTATS

3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI

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

- bactéries, souche utilisée;
- conditions expérimentales : doses, toxicité, composition des milieux, méthodes de traitement (préincubation, incubation), système d'activation métabolique, substances de référence, témoins négatifs;
- dénombrement par boîte, nombre moyen de colonies révertantes par boîte, écart-type, relation effet/dose si possible;
- discussion des résultats;
- interprétation des résultats.

3.2. EVALUATION ET INTERPRETATION

Voir introduction générale partie B (point D).

4. REFERENCES

Voir introduction générale partie B (point E).

PARTIE C : METHODES DE DETERMINATION DE L'ECOTOXICITE

C.1. TOXICITE AIGUE VIS-A-VIS DES POISSONS

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai a pour objet de déterminer la toxicité aiguë létale d'une substance vis-à-vis des poissons en eau douce. Dans la mesure du possible, il est souhaitable de disposer, 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 (statique, semi-statique ou dynamique), permettant d'assurer des concentrations constantes satisfaisantes de la substance d'essai pendant la période expérimentale.

Des informations supplémentaires (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La toxicité aiguë est l'effet préjudiciable et observable provoqué 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 % des poissons d'un lot soumis aux essais pendant une période d'exposition continue qui est à indiquer.

Toutes les concentrations de la substance d'essai sont indiquées en poids par volume (mg/l). Elles peuvent également être exprimées en poids par poids (mg/kg).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

On pourra soumettre à essai une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la réponse de l'espèce utilisée pour l'essai n'a pas varié de façon significative.

Aucune substance de référence n'est indiquée pour cet essai.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations pendant une période de 96 heures. Les mortalités sont notées 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 moment d'observation.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

La mortalité des témoins ne doit pas dépasser 10 % (ou un poisson, si le nombre d'animaux utilisés pour l'essai est inférieur à 10) à la fin de l'essai.

La concentration en oxygène doit être supérieure à 60 % de la concentration saturante pendant toute la durée de l'essai.

La concentration de la substance d'essai sera maintenue au moins à 80 % de la concentration initiale pendant toute la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui donnent des solutions stables, c'est-à-dire les substances qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas en quantité significative, on peut considérer que la concentration initiale est la même que la concentration nominale. Il faudra prouver que la concentration a été maintenue constante pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont :

- i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou
- ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou
- iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale retenue sera la concentration mesurée dans la solution (ou si cela s'avère techniquement impossible, mesurée dans la colonne d'eau) au début de l'essai. La concentration doit être mesurée après une période d'équilibrage mais avant l'introduction des organismes d'essai.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Le pH ne doit pas varier de plus d'une unité.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

Trois types de systèmes peuvent être utilisés :

Essai en statique :

Essai de toxicité au cours duquel n'intervient pas de renouvellement de la solution à étudier (les solutions restent inchangées pendant toute la durée de l'essai.)

Essai en semi-statique :

Essai sans renouvellement continu de la solution, mais avec un renouvellement régulier de la solution d'essai après des périodes prolongées (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'essai.

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substance à tester

Les solutions mères de concentration requise sont préparées par dissolution de la substance dans de l'eau déionisée, ou dans de l'eau répondant aux conditions fixées au point 1.6.1.2.

Les concentrations choisies pour l'essai sont préparées par dilution de la solution mère. Si l'on procède à des essais à concentrations élevées, la substance peut être dissoute directement dans l'eau de dilution.

Les substances ne doivent normalement être testées que jusqu'à la limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple, les substances qui sont peu hydrosolubles, ou qui ont un P_{ow} élevé, ou qui forment dans l'eau une dispersion stable plutôt qu'une véritable solution) il est possible d'utiliser une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance pour être sûr que la concentration soluble/stable maximale a bien été atteinte. Il est toutefois important que cette concentration ne perturbe pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple, formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions-mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu d'essai. Quand des substances auxiliaires de ce type sont utilisées, toutes les concentrations d'essai doivent contenir la même quantité de substance auxiliaire, et un lot témoin supplémentaire de poissons doit être exposé à la même concentration de substance auxiliaire que celle qui est utilisée dans les séries d'essais. La concentration de tels auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas excéder 100 mg/l dans le milieu d'essai.

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. Dans ce cas, 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. Pour ce faire, on utilisera de préférence HCl et NaOH. Cet ajustement doit être effectué de manière à ce que la concentration de la substance d'essai dans la solution mère ne soit pas sensiblement modifiée. Si l'ajustement entraîne une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il faut consigner ces observations dans le procès-verbal.

1.6.1.2. Eau d'élevage et de dilution

On peut utiliser de l'eau potable (non contaminée par des concentrations potentiellement nocives de chlore, de métaux lourds ou d'autres substances), de l'eau naturelle de bonne qualité ou de l'eau reconstituée (voir annexe 1). On utilisera de préférence des eaux dont la dureté totale est comprise entre 10 et 250 milligrammes par litre (en CaCO_3), et dont le pH est compris entre 6,0 et 8,5.

1.6.2. Appareillage

Tout l'appareillage doit être en matériau chimiquement inerte :

- système de dilution automatique (pour 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;
- pHmètre.

1.6.3. Poissons soumis à l'essai

Les poissons doivent être en bonne santé et ne présenter aucune malformation apparente.

Les espèces utilisées doivent être choisies sur la base de critères pratiques, tels que leur disponibilité toute l'année, leur facilité d'entretien, leur commodité pour l'essai, leur sensibilité relative aux produits chimiques et tous facteurs significatifs sur le plan économique, biologique ou écologique. Dans le choix des espèces de poissons, il faut également prendre en considération la nécessité de pouvoir comparer les résultats et l'harmonisation internationale existante (référence 1).

Une liste des espèces de poissons recommandées pour la réalisation de cet essai figure à l'annexe 2; le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel sont les espèces à utiliser de préférence.

1.6.3.1. Elevage

Les poissons soumis à l'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 :

charge biologique :

appropriée au système utilisé (avec recirculation ou en dynamique) et aux espèces de poissons,

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 en air,

alimentation :

quotidienne ou trois 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 morts et appliquer 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 rejeté.

- 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 mêmes conditions que celles 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 à utiliser lors de l'essai définitif.

Procéder, en plus de la série d'essais, à un essai témoin sans substance à étudier, et, le cas échéant, à un essai témoin contenant le produit auxiliaire.

En fonction des propriétés physiques et chimiques de la substance à étudier, on choisira une méthode appropriée statique, semi-statique ou dynamique, qui réponde aux critères de qualité.

Les poissons sont exposés à la substance d'essai dans les conditions suivantes :

- durée : 96 heures;
- nombre d'animaux : au moins 7 par concentration;
- récipients : d'une capacité appropriée, en fonction de la charge biologique recommandée;
- charge biologique : charge maximale recommandée pour l'essai statique ou semi-statique : 1,0 gramme par litre; pour les essais dynamiques, une charge plus élevée peut être acceptable;
- concentrations d'essai : au moins cinq concentrations qui diffèrent d'un facteur constant n'excédant pas 2,2 et couvrent, dans la mesure du possible, 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 (annexe 2), mais constante à ± 1 °C près, quel que soit le système d'essai;
- concentration en oxygène dissous : au moins 60 % de la concentration saturante en air à la température choisie;
- nourriture : aucune.

Les poissons sont examinés après 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, perturbations au niveau de la nage, des fonctions respiratoires, de la pigmentation, etc.) seront consignées.

Les mesures du pH, de l'oxygène dissous et de la température doivent être effectuées quotidiennement.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué à une concentration de 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode d'essai, afin de montrer que la CL_{50} est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1.).

L'essai limite doit être effectué avec 7 à 10 poissons, et avec un nombre identique dans le(s) lot(s) témoin(s). (Selon la théorie binomiale, lorsque l'on utilise 10 poissons avec une mortalité nulle, il y a 99,9 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée dans l'essai limite. Avec 7, 8 ou 9 poissons et une mortalité nulle, il y a 99 % de chance que la CL_{50} soit supérieure à la concentration utilisée.)

En cas de mortalité, il convient d'effectuer un essai complet. Si des effets sub-létaux sont observés, ceux-ci doivent être consignés.

2. EVALUATION DES DONNEES

Reporter, sur un papier log-probit, le pourcentage de mortalité pour chaque période d'exposition recommandée (24, 48, 72 et 96 heures) en fonction de la concentration.

Pour chaque temps d'observation, estimer, lorsque cela est possible, la CL_{50} et l'intervalle de confiance ($p = 0,05$) par les méthodes classiques; les valeurs obtenues doivent être arrondies à un ou deux (maximum) chiffres significatifs (exemples de nombres arrondis à deux chiffres : 170 pour 173,5; 0,13 pour 0,127; 1,2 pour 1,21).

Dans le cas où la pente de la courbe de pourcentage en fonction de la concentration est trop forte pour permettre de calculer la CL_{50} , il suffit de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations consécutives dans un rapport de 2,2 donnent 0 et 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 les résultats seront interprétés avec prudence.

3. RESULTATS

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

- des informations sur les poissons soumis à essai (nom scientifique, souche, fournisseur, tout prétraitement, taille et nombre utilisé pour chaque concentration d'essai);
- origine et principales caractéristiques de l'eau de dilution (pH, dureté, température);
- dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai;
- dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai;
- concentration de tout produit auxiliaire;
- liste des concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité de la substance d'essai dans la solution d'essai à ces concentrations;
- si on procède à des analyses chimiques, méthodes utilisées et résultats;
- éventuellement, résultats de l'essai limite;
- motifs du choix et description détaillée de la méthode utilisée (par exemple système statique, semi-statique, taux d'administration, taux de renouvellement, aération ou non, charge en poisson, etc.);
- description du matériel d'essai;
- régime d'éclairage;
- concentration en oxygène dissous, pH et température des solutions d'essai toutes les 24 heures;
- preuves que les critères de qualité ont été respectés;
- tableau contenant la mortalité cumulée pour chaque concentration et pour le témoin (et, au besoin, le témoin contenant la substance auxiliaire) à chaque temps d'observation recommandé;
- représentation graphique du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration à la fin de l'essai;
- si possible, valeurs de la CL_{50} pour chacun des temps d'observation recommandés (avec l'intervalle de confiance à 95 %);
- méthodes statistiques employées pour déterminer les valeurs de la CL_{50} ;
- si une substance de référence est utilisée, les résultats obtenus;
- la concentration d'essai la plus élevée qui ne cause pas de mortalité pendant la durée de l'essai;
- la concentration d'essai la plus basse qui cause une mortalité de 100 % des poissons pendant la durée de l'essai.

4. REFERENCES

- 1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 203, Décision du Conseil C(81) 30 Final et mises à jours.
- 2) AFNOR — NFT 90,303 juin 1985—Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Brachydanio rerio* — Méthode statique et dynamique.
- 3) AFNOR — NFT 90,305 juin 1985 — Détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du *Salmo gairdneri* — Méthode statique et dynamique.
- 4) ISO 7346/1, /2 and /3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan — *Teleostei, Cyprinidae*). Part 1 : Static method. Part 2 : Semi-static method. Part 3 : Flow-through method.
- 5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz : Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden — Part II 1974.
- 6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L(15).
- 7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.
- 8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- 9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- 10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.
- 11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- 12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- 13) Commission of the European Communities, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- 14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die Okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- 15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. and Exp. Therap., 1949, vol 96, 99.
- 16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.
- 17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821
- 18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3- 32.
- 19) Stephan, C.E. Methods for calculating an LC_{50} . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, 1977, 65-84.
- 20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50} . US EPA.

Annexe 1

Eau reconstituée

Exemple d'eau de dilution appropriée

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau doit être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau déionisée d'une conductivité inférieure à $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

L'appareillage pour la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément en cuivre.

Solutions mères

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (chlorure de calcium dihydraté) : 11,76 g

dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (sulfate de magnésium heptahydraté) : 4,93 g

dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre

NaHCO_3 (hydrogénocarbonate de sodium) : 2,59 g

dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre

KCl (chlorure de potassium) : 0,23 g

dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions mères et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer jusqu'à saturation en oxygène dissous 1qy.

Le pH doit être de $7,8 \pm 0,2$.

Si nécessaire, ajuster le pH 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.

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.

Annexe 2

Espèces de poissons recommandées pour l'essai

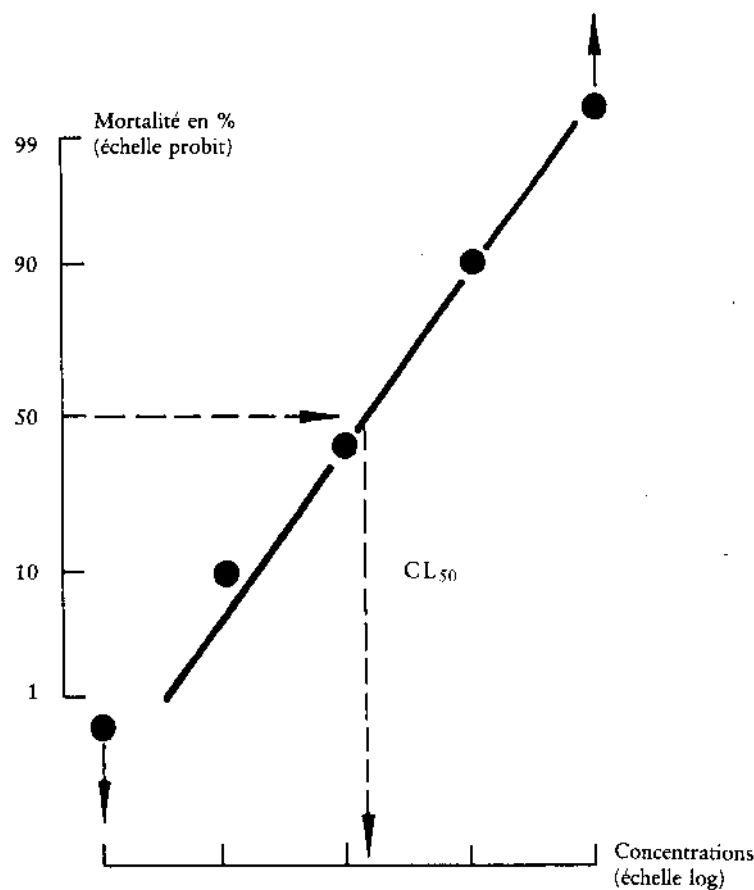
Espèces recommandées	Intervalles des températures d'essai recommandé (°C)	Longueur totale recommandée de l'animal soumis à l'essai (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Danio zébré	20 à 24	$3,0 \pm 0,5$
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Tête de boule	20 à 24	$5,0 \pm 2,0$
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Carpe commune	20 à 24	$6,0 \pm 2,0$
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck et Schlegel 1850) Nedaka	20 à 24	$3,0 \pm 1,0$
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) Guppy	20 à 24	$3,0 + 1,0$
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus 1758) Crapet arlequin	20 à 24	$5,0 \pm 2,0$
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) Truite arc-en-ciel	12 à 17	$6,0 \pm 2,0$
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus 1758) Ide mélanote	20 à 24	$6,0 \pm 2,0$

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 partout dans le monde.

Annexe 3

Exemple de courbe de pourcentage de mortalité en fonction de la concentration

Exemple de détermination de la CL_{50} sur papier log-probit

C.2. TOXICITE AIGUE VIS-A-VIS DES DAPHNIES

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai a pour objet de déterminer la concentration médiane effective (CE_{50}) d'une substance qui immobilise les daphnies en eau douce. Il est souhaitable de disposer, autant que possible, d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance à étudier avant de procéder à l'essai.

Des informations supplémentaires (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage d'impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

La détermination de la CE_{50} telle qu'elle est décrite dans la présente méthode d'essai répond à l'exigence de la directive concernant la CL_{50} vis-à-vis des daphnies.

Dans cet essai, la toxicité aiguë est exprimée par la concentration médiane effective (CE_{50}) d'immobilisation, c'est-à-dire la concentration, en termes de valeur initiale, qui immobilise 50 % des daphnies, dans un lot d'essai, au cours d'une période d'exposition continue qui doit être définie.

Immobilisation :

Les animaux qui sont incapables de nager pendant les 15 secondes qui suivent une légère agitation du récipient d'essai sont considérés comme immobiles.

Toutes les concentrations de la substance à étudier sont indiquées en poids par volume (mg/l). Elles peuvent aussi être exprimées en poids par poids (mg/kg).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

Une substance de référence peut être soumise à essai afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la sensibilité de la souche utilisée pour l'essai n'est pas significativement modifiée.

Un tableau récapitulatif des résultats d'un essai circulaire de la CEE portant sur quatre substances différentes est donné à l'annexe 2.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CE_{50} est supérieure à cette concentration.

Les daphnies sont exposées à la substance à étudier ajoutée à l'eau, dans une série de concentrations donnée, pendant une période de 48 heures. Si l'essai effectué est plus court, il conviendra d'en mentionner la justification dans le procès-verbal.

Dans des conditions d'essai identiques et pour une gamme de concentrations adéquates, des concentrations différentes en substance d'essai ont des effets différents sur la capacité de nage des daphnies. En conséquence, en fin d'essai, à chaque concentration correspond un pourcentage différent d'immobilisation des daphnies. Les concentrations provoquant 0 ou 100 % d'immobilisation sont déterminées directement par l'observation, tandis que la CE_{50} - 48 heures est, si possible, déterminée par calcul.

Pour cette méthode, on utilise un système statique, sans renouvellement des solutions d'essai pendant la période d'exposition.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

L'immobilisation des témoins ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai.

Les daphnies des lots témoins ne doivent pas se trouver engluées à la surface de l'eau.

Il est souhaitable que la concentration en oxygène dissous dans les récipients d'essai reste supérieure à 3 mg/l pendant le déroulement de l'essai. Elle ne doit, en aucun cas, descendre en dessous de 2 mg/l.

La concentration de la substance d'essai doit être maintenue dans la limite de 80 % de la concentration initiale pendant toute la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui produisent des solutions stables, c'est-à-dire qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas d'une manière significative, on peut considérer que la concentration initiale est équivalente à la concentration nominale. Il faudra prouver que la concentration a été maintenue constante pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont :

- (i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou
- (ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou
- (iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale retenue sera la concentration mesurée dans la solution (ou si cela s'avère techniquement impossible, mesurée dans la colonne d'eau) au début de l'essai. La concentration sera déterminée après une période d'équilibrage mais avant l'introduction des organismes d'essai.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai, pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Le pH ne doit pas varier de plus d'une unité.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substance d'essai

Des solutions mères de concentration requise 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.

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.

Les substances ne doivent normalement être testées que jusqu'à la limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple les substances faiblement hydrosolubles, ou dont le P_{ow} est élevé, ou encore pour celles qui forment une dispersion stable plutôt qu'une vraie solution dans l'eau), on peut effectuer un essai à une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance afin de garantir qu'une concentration maximale soluble/stable a été obtenue. Il est toutefois important que cette concentration ne modifie pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple par formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu. Si on fait appel à ce type de substances auxiliaires, toutes les concentrations de l'essai doivent en contenir une quantité identique et des daphnies témoins supplémentaires doivent être exposées à une concentration en produit auxiliaire identique à celle utilisée dans la série d'essais. La concentration de ces auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas dépasser 100 mg/l dans le milieu d'essai.

L'essai doit être effectué sans ajustement de pH. En cas de modification significative du pH, il est souhaitable de répéter l'essai en ajustant le pH et de noter les résultats. Dans ce cas, 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. On utilisera à cet effet de préférence 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 mère. Si l'ajustement provoquait une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il conviendrait de consigner ces observations au procès-verbal.

1.6.1.2. Eau pour l'essai

Pour cet essai, on utilise de l'eau reconstituée (voir annexe 1 et référence (2) : ISO 6341). Afin d'éviter de devoir procéder à des adaptations avant essai, il est recommandé d'utiliser pour l'élevage une eau de même qualité (pH, dureté) que celle utilisée pour l'essai.

1.6.2. Appareillage

On utilise l'appareillage et 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 approprié pour le contrôle de la température;
- pHmètre;
- appareil permettant de déterminer la dureté de l'eau.

1.6.3. Organisme soumis à l'essai

Daphnia magna est l'espèce utilisée de préférence, bien qu'il soit aussi permis d'utiliser *Daphnia pulex*. Les organismes utilisés pour l'essai seront âgés de moins de 24 heures au début de l'essai, élevés en laboratoire, exempts de toute maladie, et d'origine connue (par exemple 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 sans la substance d'essai et, si besoin est, un essai témoin avec la substance auxiliaire sont effectués en plus des séries d'essai.

Les daphnies sont exposées à la substance d'essai dans les conditions suivantes :

- *durée* : de préférence 48 heures;
- *nombre d'organismes* : au moins 20 organismes par concentration d'essai, répartis de préférence en quatre lots de cinq ou en deux lots de dix;
- *charge biologique* : un minimum de 2 ml 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. Les concentrations sont choisies selon une série géométrique, avec un facteur n'excédant pas 2,2. En même temps que les témoins, on doit soumettre à l'essai des concentrations suffisantes pour obtenir 0 et 100 % d'immobilisation après 48 heures et une série de degrés d'immobilisations intermédiaires permettant de calculer la CE_{50} — 48 heures;
- *eau* : voir point 1.6.1.2;
- *lumière* : un cycle lumière-obscurité est optionnel;
- *température* : la température d'essai doit se situer entre 18 et 22 °C, mais elle doit, pour chaque essai, être constante à ± 1 °C près;
- *aération* : les solutions d'essai ne doivent pas être aérées par barbotage;
- *nourriture* : néant;

Le pH et la concentration en oxygène des témoins et de toutes les concentrations d'essai doivent 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 manque en oxygène.

Les daphnies sont examinées au moins après 24 heures d'exposition et à nouveau après 48 heures.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué avec 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode, afin de montrer que la CE_{50} est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1).

L'essai limite doit être effectué en utilisant 20 daphnies, réparties en deux ou en quatre lots et un nombre identique dans le(s) témoin(s). S'il y a immobilisation, une étude complète doit être effectuée.

2. EVALUATION DES DONNEES

Reporter sur un papier log-probit, le pourcentage d'immobilisation pour chaque période d'exposition à laquelle des observations ont été faites (24 et 48 heures), en fonction de la concentration.

Pour chaque temps d'observation, estimer, lorsque cela est possible, la CE_{50} et l'intervalle de confiance ($p = 0,05$) par les méthodes classiques; les valeurs obtenues doivent être arrondies à un ou deux (maximum) chiffres significatifs (exemples de nombres arrondis à deux chiffres : 170 pour 173,5; 0,13 pour 0,127; 1,2 pour 1,21).

Dans le cas où la pente de la courbe est trop forte pour permettre le calcul de la CE_{50} , il suffit de procéder à une estimation graphique de cette valeur.

Lorsque deux concentrations immédiatement consécutives, dans un rapport de 2,2, donnent 0 et 100 % d'immobilisation, ces deux valeurs suffisent à indiquer l'intervalle dans lequel se situe la CE_{50} .

Si l'on constate que la stabilité ou l'homogénéité de la substance à étudier ne peut pas être maintenue, cette observation doit être mentionnée et les résultats seront interprétés avec prudence.

3. RESULTATS

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

- des informations sur l'organisme d'essai (nom scientifique, souche, fournisseur ou origine, tout prétraitement, méthode d'élevage, y compris origine, nature, quantité de nourriture et fréquence de l'alimentation);
- origine et principales caractéristiques (à savoir, pH, dureté, température) de l'eau de dilution;
- dans le cas de substances faiblement hydrosolubles, méthode de préparation de la solution mère et de la solution d'essai;
- concentrations de tout produit auxiliaire utilisé;
- liste des concentrations utilisées et toute information disponible sur la stabilité de la substance d'essai en solution à ces concentrations;
- si on procède à des analyses chimiques, méthodes utilisées et résultats;
- éventuellement, résultats de l'essai limite;
- description du matériel d'essai;
- régime d'éclairage;
- concentration en oxygène dissous, valeur du pH et de la température des solutions d'essai;
- preuves que les critères de qualité ont été respectés;
- tableau contenant les immobilisations cumulées pour chaque concentration et pour le témoin (et, au besoin, le témoin contenant la substance auxiliaire) à chaque temps d'observation recommandé (24 et 48 heures);
- représentation graphique du pourcentage de daphnies immobilisées en fonction de la concentration à la fin de l'essai;

- si possible, valeurs de la CE_{50} pour chacun des temps d'observation recommandés (avec l'intervalle de confiance à 95 %);
- méthodes statistiques employées pour déterminer les valeurs de la CE_{50} ;
- si une substance de référence est utilisée, les résultats obtenus;
- la concentration d'essai la plus élevée qui ne cause pas d'immobilisation pendant la durée de l'essai;
- la concentration d'essai la plus basse qui cause une immobilisation de 100 % durant l'essai.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 202, Décision du Conseil C(81) 30 Final et mises à jour.
- (2) International Standard ISO, Water Quality — Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989.
- (3) AFNOR NFT 90 301 janvier 1983 — Inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera — crustacea).
- (4) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- (5) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen 38412 (L1) und (L11).
- (6) Finney, D. J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.
- (7) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effects experiments, J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, p. 99-113.
- (8) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793- 821.
- (9) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3- 32.
- (10) Stephan, C. E. Methods for calculating an LC_{50} . In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials. ASTM STP 634, p. 65-84, 1978.
- (11) Stephan, C. E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC_{50} . US EPA.

Annexe I

Eau reconstituée

Exemple d'eau de dilution appropriée (selon ISO 6341)

Tous les produits chimiques doivent être de qualité analytique.

L'eau doit être une eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau déionisée d'une conductivité inférieure à $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

L'appareillage pour la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément en cuivre.

Solutions mères

CaCl ₂ · 2 H ₂ O (chlorure de calcium dihydraté) :	11,76 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (sulfate de magnésium heptahydraté) :	4,93 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
NaHCO ₃ (hydrogénocarbonate de sodium) :	2,59 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	
KCl (chlorure de potassium) :	0,23 g
dissoudre dans de l'eau, compléter à un litre	

Eau de dilution reconstituée

Mélanger 25 ml 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 $7,8 \pm 0,2$.

Si nécessaire, ajuster le pH 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 et 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 changements éventuels dans la préparation de l'eau de dilution ne doivent pas modifier la composition ou les propriétés de cette eau.

Annexe 2

Tableau récapitulatif des résultats d'un essai circulaire de la CEE réalisé en 1978 (cité également dans la référence (2))

Attention : L'objectif de cet essai circulaire était de déterminer la CE_{50} 24 heures.

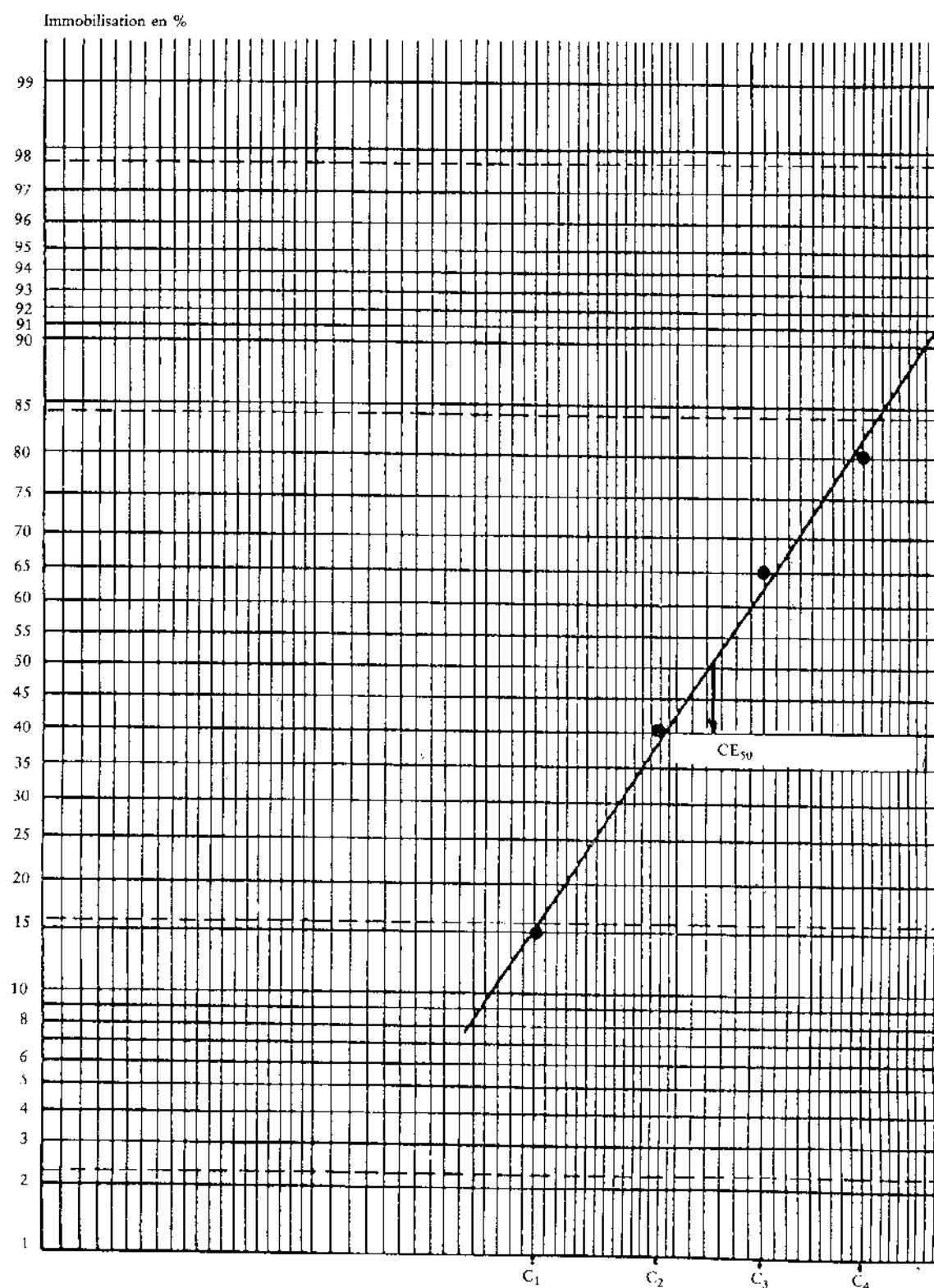
Substances utilisées :

- 1) Bichromate de potassium
- 2) Acide tétrapropylbenzènesulfonique
- 3) Acide tétrapropylbenzènesulfonique, sel de sodium
- 4) Acide trichloro-2,4,5-phénoxyacétique, sel de potassium

Substance	Nombre de laboratoires participants	Nombre de résultats pour les calculs	$CE_{50-24 \text{ h}}$ mg/l moyenne
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

Appendice 3

Exemple de courbe de pourcentage d'immobilisation en fonction de la concentration

Exemple de détermination de la CE_{50} à l'aide de papier log-probit

C.3. ESSAI D'INHIBITION DES ALGUES

1. METHODE

1.1. INTRODUCTION

Cet essai a pour objectif de déterminer les effets d'une substance sur la croissance d'algues vertes unicellulaires. Des essais de relativement courte durée (72 heures) peuvent permettre de mesurer les effets sur plusieurs générations. Cette méthode peut être adaptée de manière à être applicable à plusieurs espèces d'algues unicellulaires; dans ce cas une description de la méthode utilisée doit figurer dans le procès-verbal d'essai.

Cette méthode est extrêmement facile à appliquer aux substances hydrosolubles, qui, dans les conditions de l'essai, sont susceptibles de rester dans l'eau.

Elle peut être utilisée pour des substances n'interférant pas directement avec la mesure de la croissance des algues.

Il est souhaitable de disposer, si possible, d'informations sur l'hydrosolubilité, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation et la biodégradabilité de la substance à étudier avant de procéder à l'essai.

D'autres informations (par exemple, la formule développée, le degré de pureté, la nature et le pourcentage d'impuretés significatives, la présence et la quantité d'additifs, le coefficient de partage n-octanol/eau) doivent être prises en considération lors de la conception de l'essai et de l'interprétation des résultats.

1.2. DEFINITIONS ET UNITES

Densité cellulaire : nombre de cellules par millilitre,

Croissance : augmentation de la densité cellulaire pendant la durée de l'essai,

Taux de croissance : augmentation de la densité cellulaire par unité de temps,

CE₅₀ : dans cette méthode, la concentration de la substance à étudier qui provoque une réduction de 50 %, soit de la croissance (CE_{50b}), soit du taux de croissance (CE_{50r}) par rapport au témoin,

CSEO (concentration sans effet observé) : dans cette méthode, la concentration d'essai la plus élevée ne provoquant pas d'inhibition de croissance significative par rapport au témoin.

Toutes les concentrations de la substance à étudier sont données en poids par volume (mg/l). Elles peuvent aussi être exprimées en poids par poids (mg/kg).

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

On peut soumettre à essai une substance de référence afin de démontrer que, dans les conditions d'essai en laboratoire, la sensibilité de l'espèce utilisée pour l'essai n'est pas sensiblement modifiée.

Si une substance de référence est utilisée, les résultats doivent être consignés dans le procès-verbal. Le bichromate de potassium peut être utilisé comme substance de référence, mais sa coloration peut affecter la qualité et l'intensité de la lumière parvenant aux cellules ainsi que les éventuelles mesures spectrophotométriques. Le bichromate de potassium a été utilisé pour un essai inter-laboratoires effectué à l'échelle internationale (voir réf. (3) et Annexe 2).

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE D'ESSAI

Un essai limite peut être effectué à 100 mg/l afin de démontrer que la CE₅₀ est supérieure à cette concentration.

Des cultures d'une espèce choisie d'algues vertes en phase de croissance exponentielle sont exposées à différentes concentrations de la substance à étudier pendant plusieurs générations dans des conditions définies.

Les solutions d'essai sont incubées pendant une période de 72 heures, au cours de laquelle on mesure la densité cellulaire dans chaque solution au moins toutes les 24 heures. L'inhibition de la croissance est déterminée par rapport à une culture témoin.

1.5. CRITERES DE QUALITE

Les critères de qualité doivent s'appliquer à l'essai limite aussi bien qu'à l'essai complet.

La densité cellulaire doit avoir augmenté d'au moins un facteur 16 en trois jours dans les cultures témoins.

La concentration de la substance à étudier doit être maintenue à 80 % au moins de la concentration initiale pendant la période correspondant à la durée de l'essai.

Pour les substances qui se dissolvent facilement dans le milieu d'essai et qui produisent des solutions stables, c'est-à-dire qui ne se volatilisent pas, ne se dégradent pas, ne s'hydrolysent pas ou ne s'adsorbent pas d'une manière significative, on peut considérer que la concentration initiale est équivalente à la concentration nominale. Il faudra montrer que la concentration a été maintenue pendant la durée de l'essai et que les critères de qualité ont été respectés.

Pour les substances qui sont :

- (i) peu solubles dans le milieu d'essai, ou
- (ii) susceptibles de former des émulsions ou des dispersions stables, ou
- (iii) instables en solution aqueuse,

la concentration initiale sera la concentration mesurée dans la solution au début de l'essai. Elle devra être déterminée après une période d'équilibrage.

Dans tous les cas cités ci-dessus, il y a lieu d'effectuer des mesures supplémentaires au cours de l'essai pour confirmer les concentrations réelles d'exposition et que les critères de qualité ont été respectés.

Il est admis que des quantités significatives de la substance à étudier peuvent être incorporées dans la biomasse d'algues pendant la durée de l'essai. C'est pourquoi il convient, pour montrer que les critères de qualité cités ci-dessus sont respectés, de prendre en compte la substance incorporée dans la biomasse d'algues ainsi que la substance en solution (ou, en cas d'impossibilité technique, mesurée dans la colonne d'eau). La mesure de la concentration de la substance dans la biomasse d'algues pouvant, cependant, poser des problèmes techniques importants, on peut montrer que les critères de qualité sont respectés en effectuant un essai avec la concentration de la substance à étudier la plus élevée, mais en absence d'algues, et en mesurant les concentrations dans la solution (ou, en cas d'impossibilité technique, mesurée dans la colonne d'eau) au début et à la fin de la période de l'essai.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

1.6.1. Réactifs

1.6.1.1. Solutions de substance d'essai

Des solutions mères de concentration requise 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.

Les concentrations d'essai choisies sont préparées en ajoutant la quantité appropriée de solution mère à des pré-cultures d'algues (voir annexe 1).

Les substances ne doivent normalement pas être testées au delà de leur limite de solubilité. Pour certaines substances (par exemple les substances faiblement hydrosolubles, ou dont le P_{ow} est élevé, ou encore pour celles qui forment une dispersion stable plutôt qu'une vraie solution dans l'eau), on peut effectuer un essai à une concentration supérieure à la limite de solubilité de la substance afin de s'assurer que la concentration soluble/stable maximale a été atteinte. Il est toutefois important que cette concentration ne modifie pas, par ailleurs, les conditions de l'essai (par exemple par formation d'un film de substance à la surface de l'eau empêchant l'oxygénation de l'eau, etc.).

Dans le cas de substances à faible hydrosolubilité, on peut avoir recours à la dispersion ultrasonique, à des solvants organiques, des émulsifiants ou des dispersants, pour préparer les solutions mères ou également pour faciliter la dispersion de ces substances dans le milieu d'essai. Si on fait appel à ces substances auxiliaires, toutes les concentrations

d'essai doivent contenir la même quantité de substances auxiliaires et des témoins supplémentaires doivent être exposés à une concentration de produit auxiliaire identique à celle utilisée pour les séries d'essais. La concentration de ces auxiliaires doit être limitée et ne doit en aucun cas dépasser 100 mg/l de milieu d'essai.

L'essai doit être effectué sans ajustement de pH. En cas de modification significative 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 ajustée à la valeur du pH de l'eau de dilution à moins que des raisons particulières ne s'y opposent. Pour ce faire, on utilisera de préférence 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 mère. Si l'ajustement provoquait une réaction chimique ou une précipitation de la substance d'essai, il conviendrait de consigner ces observations au procès-verbal.

1.6.1.2 Milieu d'essai

L'eau doit être de l'eau distillée de bonne qualité, ou de l'eau déionisée d'une conductivité inférieure à $5 \mu\text{S cm}^{-1}$. L'appareil servant à la distillation de l'eau ne doit contenir aucun élément de cuivre.

Le milieu suivant est recommandé :

On prépare quatre solutions mères, conformément au tableau ci-après. Les solutions mères sont stérilisées par filtration sur membrane ou par autoclavage et stockées dans l'obscurité à 4°C . La solution mère n° 4 doit être stérilisée uniquement par filtration sur membrane. Ces solutions mères sont diluées pour atteindre les concentrations finales en substances nutritives dans les solutions d'essai.

Substance nutritive	Concentration dans la solutions mère	Concentration finale dans la solution d'essai
Solution mère 1: macro-nutriments		
NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	12 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l	18 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	15 mg/l
KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
Solution mère 2: Fe-EDTA		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/l	0,08 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	0,1 mg/l
Solution mère 3: oligo-éléments		
H_3BO_3	185 mg/l	0,185 mg/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	0,415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l	3×10^{-3} mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$ mg/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l	10^{-5} mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	7×10^{-3} mg/l
Solution mère 4: NaHCO_3		
NaHCO_3	50 g/l	50 mg/l

Après équilibrage avec l'air, le pH du milieu est environ de 8.

1.6.2. Appareillage

- matériel courant de laboratoire;
- flacons d'essai d'un volume approprié (on peut, par exemple utiliser des flacons coniques de 250 ml pour un volume de solution d'essai de 100 ml). Tous les flacons d'essai doivent être identiques en ce qui concerne la matière et les dimensions;
- matériel de culture : une enceinte ou une pièce dans laquelle la température peut être maintenue dans un intervalle compris entre 21 et 25°C avec une précision de $\pm 2^\circ\text{C}$ et munie d'un dispositif d'éclairage continu et uniforme dont le spectre d'émission est compris entre 400 et 700 nm. Si les algues des cultures témoins atteignent le taux de croissance recommandé, on peut estimer que les conditions de croissance, y compris l'intensité lumineuse, sont appropriées.

Il est recommandé d'utiliser, au niveau moyen des solutions d'essai, une intensité lumineuse comprise entre 60 et $120 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (de 35 à 70×10^{18} photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) mesurée dans la gamme de 400 à 700 nm à l'aide d'un récepteur approprié. Pour les appareils de mesure de la lumière étalonnés en lux, un intervalle équivalent, de 6 000 à 10 000 lux, est acceptable.

Cette intensité lumineuse peut être fournie par quatre à sept ampoules fluorescentes de 30 W, du type blanc classique (température de couleur d'environ 4 300 K), placées à une distance de 0,35 m de la culture d'algues.

- les mesures de la densité cellulaire doivent être effectuées par comptage direct des cellules vivantes, par exemple à l'aide d'un microscope et de cellules de comptage. Toutefois, on peut utiliser d'autres méthodes (photométrie, turbidimétrie,...) à condition qu'elles soient suffisamment sensibles et s'il est montré qu'elles donnent une bonne corrélation avec la densité cellulaire.

1.6.3. Organismes soumis à l'essai

Il est conseillé d'utiliser des espèces d'algues vertes à croissance rapide qui soient commodes, tant pour la culture que pour l'essai. On utilise de préférence les espèces suivantes :

- *Selenastrum capricornutum*, par ex. ATCC 22662 ou CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, par ex. 86.81 SAG.

Note :

ATCC = American Type Culture Collection (Etats-Unis)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (R.U.)

SAG = Collection de cultures d'algues (Göttingen, RFA).

Si d'autres espèces sont utilisées, la souche doit être mentionnée.

1.6.4. Mode opératoire

Des essais sont effectués afin de déterminer la gamme de concentrations dans laquelle des effets sont susceptibles de se produire.

Les deux mesures de la croissance (biomasse et taux de croissance) peuvent fournir des valeurs très différentes de l'inhibition de la croissance; ces deux types de mesure devraient être utilisés dans les essais de recherche de l'intervalle de concentrations afin de s'assurer que la progression géométrique des concentrations permettra d'estimer à la fois la CE_{50b} et la CE_{50r} .

Densité cellulaire initiale

La densité cellulaire initiale recommandée dans les cultures d'essai est de 10^4 cellules/ml environ pour *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus*. Si l'on utilise d'autres espèces, la biomasse doit être comparable.

Concentrations de la substance à tester

Pour l'essai, on choisit au moins cinq concentrations en série géométrique avec un facteur n'excédant pas 2,2. La concentration la plus faible testée ne doit avoir aucun effet visible sur la croissance des algues. La concentration la plus élevée doit inhiber la croissance d'au moins 50 % par rapport au témoin et de préférence l'arrêter complètement.

Répétitions et témoins

Le protocole d'essai doit comporter trois répétitions de chaque concentration d'essai. Trois témoins sans substance à étudier doivent être soumis à l'essai ainsi que, s'il y a lieu, trois témoins contenant la substance auxiliaire. Le protocole d'essai peut, si cela se justifie, être modifié afin d'augmenter le nombre de concentrations et de réduire le nombre de répétitions par concentration.

Mode opératoire

Des cultures d'essai contenant les concentrations choisies de substance à étudier et la quantité désirée d'inoculum d'algues sont préparées par addition de quantités déterminées de solutions mères de substance d'essai à des quantités appropriées de précultures d'algues (voir Annexe 1).

Les flacons de culture sont agités et placés dans l'appareil de culture. Les algues sont maintenues en suspension par agitation, en les remuant ou par barbotage d'air, afin d'augmenter les échanges gazeux et de réduire les variations de pH dans les solutions d'essai. Les cultures doivent être maintenues à une température se situant entre 21 et 25 °C, avec une précision de ± 2 °C.

La densité cellulaire est mesurée dans chaque flacon au moins 24, 48 et 72 heures après le début de l'essai. Lorsque la densité cellulaire est estimée à l'aide d'une méthode autre que le comptage direct, on mesure le bruit de fond à l'aide d'un milieu de culture d'algues filtré contenant la concentration appropriée du produit chimique à étudier.

Le pH est mesuré au début de l'essai et 72 heures plus tard.

Le pH des témoins ne devrait normalement pas varier de plus de 1,5 unité au cours de l'essai.

Essais concernant des substances volatiles

A l'heure actuelle il n'existe aucune méthode généralement reconnue pour étudier les substances volatiles. Lorsque l'on sait qu'une substance a tendance à s'évaporer, on peut utiliser des flacons d'essai fermés avec un volume mort plus important. La possibilité d'un manque de CO_2 doit être prise en considération lorsqu'on calcule le volume mort des flacons fermés. Des variantes de cette méthode ont été proposées (voir référence (4)).

Il convient d'essayer de mesurer la quantité de substance qui reste en solution et d'interpréter les résultats des essais réalisés avec les substances volatiles à l'aide de systèmes clos avec la plus grande prudence.

Essai limite

Un essai limite peut être effectué avec 100 mg/l, en suivant les procédures décrites dans cette méthode d'essai, afin de montrer que la CE_{50} est supérieure à cette concentration.

Si la nature de la substance est telle qu'il est impossible d'obtenir une concentration de 100 mg/l dans l'eau d'essai, l'essai limite doit être effectué à une concentration égale à la solubilité de la substance (ou à la concentration maximale formant une dispersion stable) dans le milieu utilisé (voir également le point 1.6.1.1.)

L'essai limite doit être effectué au moins avec trois répétitions, avec le même nombre de témoins. Les deux mesures de la croissance (biomasse et taux de croissance) doivent être utilisées pour l'essai limite.

Si, dans un essai limite, on trouve une diminution moyenne de 25 % ou plus de la biomasse ou du taux de croissance par rapport au témoin, il convient d'effectuer un essai complet.

2. EVALUATION DES DONNEES

Les densités cellulaires mesurées dans les cultures d'essai et les cultures témoins sont regroupées dans un tableau en même temps que les concentrations de la substance à étudier et les temps de mesures. La valeur moyenne de la densité cellulaire pour chaque concentration de substance à étudier et pour les témoins est reportée sur un graphique en fonction du temps (0-72 h) afin d'obtenir des courbes de croissance.

Pour déterminer la relation concentration/effet, on peut utiliser les deux méthodes suivantes. Certaines substances peuvent stimuler la croissance à de faibles concentrations. Seuls les points expérimentaux indiquant une inhibition comprise entre 0 et 100 % doivent être pris en considération.

2.1. COMPARAISON DES SURFACES DELIMITEES PAR LES COURBES DE CROISSANCE

La surface qui est comprise entre la courbe de croissance et la ligne horizontale $N = N_0$ peut être calculée à l'aide de la formule suivante :

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

où :

A = Surface

N_0 = nombre de cellules/ml mesuré au temps t_0 (début de l'essai),

N_1 = nombre de cellules/ml mesuré au temps t_1 ,

N_n = nombre de cellules/ml mesuré au temps t_n ,

t_1 = temps de la première mesure après le début de l'essai,

t_n = temps de la $n^{\text{ième}}$ mesure depuis le début de l'essai,

n = nombre de mesures effectuées depuis le début de l'essai.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire est calculé, pour chaque concentration de substance à étudier (I_A), à l'aide de la formule suivante :

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

où

A_c = surface comprise entre la courbe de croissance témoin et la ligne horizontale $N = N_0$.

A_t = surface comprise entre la courbe de croissance à une concentration t et la ligne horizontale $N = N_0$.

Les valeurs de I_A sont portées sur du papier semi-logarithmique ou sur du papier semi-logarithmique-probit en fonction des concentrations correspondantes. Si l'on utilise du papier probit, on relie les points entre eux par une ligne droite, soit à l'oeil soit par une régression calculée.

La CE_{50} est estimée à partir de la droite de régression par la concentration qui correspond à une inhibition de 50 % ($I_A = 50$ %). Afin d'éviter toute ambiguïté, il est proposé de désigner la valeur de la CE_{50} obtenue avec cette méthode de calcul par le symbole CE_{50b} . Il est important que la durée de l'exposition soit précisée avec la CE_{50b} : CE_{50b} (0-72 h)

2.2. COMPARAISON DES TAUX DE CROISSANCE

Le taux de croissance spécifique moyen (μ) pour des cultures en croissance exponentielle peut être calculé comme suit :

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

où t_0 correspond au début de l'essai.

Le taux de croissance spécifique moyen peut également être déduit de la pente de la droite de régression dans un graphe de $\ln N$ en fonction de temps.

Le pourcentage d'inhibition du taux de croissance spécifique pour chaque concentration de substance d'essai ($I_{\mu t}$) est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

où

μ_c = taux de croissance spécifique moyen des témoins

μ_t = taux de croissance spécifique moyen à la concentration d'essai t .

Le pourcentage de réduction du taux de croissance spécifique moyen pour chaque concentration de substance d'essai comparé à la valeur du témoin est porté sur un graphique en fonction du logarithme de la concentration. La CE_{50} peut être lue sur le graphique ainsi établi. Afin d'éviter toute ambiguïté, il est proposé de désigner la valeur de la CE_{50} obtenue avec cette méthode par le symbole CE_{r50} . Les temps où sont effectuées les mesures doivent être précisés; par exemple, si la valeur se rapporte aux temps 0 et 72 heures, le symbole s'écrira CE_{r50} (0-72 h).

Note : Le taux de croissance spécifique est un terme logarithmique et de faibles variations du taux de croissance peuvent donner lieu à des changements importants dans la biomasse. Les valeurs de CE_b et de CE_r ne sont donc pas comparables numériquement.

2.3. CALCUL DE LA CSEO

La Concentration Sans Effet Observé est déterminée à l'aide d'une méthode statistique appropriée à la comparaison d'échantillons multiples (par exemple l'analyse de la variance et le test de Dunnett) en utilisant les valeurs individuelles des surfaces délimitées par les courbes de croissance A (voir point 2.1) ou par les taux de croissance spécifiques μ (voir point 2.2).

3. RESULTATS

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

- substance à étudier : données concernant son identification chimique;
- organismes utilisés pour l'essai : origine, culture en laboratoire, numéro de la souche, méthode de culture;
- conditions d'essai :
- date du début et de la fin de l'essai, et sa durée;
- température;
- composition du milieu;
- matériel de culture;
- pH des solutions au début et à la fin de l'essai (des variations du pH supérieures à 1,5 unité doivent faire l'objet d'une explication);
- adjuvant et méthode utilisée pour solubiliser la substance à étudier, et concentrations de l'adjuvant dans les solutions d'essai;
- intensité et qualité de la lumière;
- concentrations étudiées (mesurées ou nominales);
- résultats :
- densité cellulaire pour chaque flacon à chaque point de mesure et méthode de mesure de la densité cellulaire;
- valeurs moyennes de la densité cellulaire;
- courbes de croissance;
- représentation graphique de la relation concentration/effet;
- valeurs de la CE et méthode de calcul;
- CSEO;
- autres effets observés.

4. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne Directrice n° 201, Décision du Conseil C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag « Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus* », in : Rodolph/Boje : Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- (3) ISO 8692 — Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi and M. Vighi — Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123- 1126.

Annexe I

Exemple de méthode de culture des algues

Observations générales

La présente méthode de culture a pour objectif de fournir des cultures d'algues permettant d'effectuer des essais de toxicité.

Il faut s'assurer, à l'aide de méthodes appropriées, que les cultures d'algues ne sont pas infectées par des bactéries (ISO 4833). Il peut être souhaitable d'utiliser des cultures axéniques mais il est essentiel de disposer de cultures unialgales.

Toutes les opérations doivent être effectuées dans des conditions stériles, afin d'éviter toute contamination aussi bien par des bactéries que par d'autres algues. Les cultures contaminées doivent être écartées.

Mode opératoire pour l'obtention de cultures d'algues

Préparation de solutions nutritives (milieux) :

Le milieu peut être préparé par dilution de solutions mères concentrées de substances nutritives. Pour les milieux solides, ajouter 0,8 % de gélose. Le milieu utilisé doit être stérile. La stérilisation par autoclavage peut provoquer une perte de NH_3 .

Cultures mères :

Les cultures mères sont de petites cultures d'algues régulièrement transférées dans du milieu frais destinées à servir de matériel d'essai initial. Si les cultures ne sont pas utilisées régulièrement, elles sont étalées sur des tubes de gélose inclinés. Ces dernières sont transférées dans un milieu frais au moins tous les deux mois.

Les cultures mères sont cultivées dans des fioles coniques contenant le milieu approprié (volume de 100 ml environ). Lorsque les algues sont incubées à 20 °C et éclairées en permanence, il est nécessaire de les repiquer toutes les semaines.

Le transfert d'un prélèvement d'une « vieille » culture dans une fiole de milieu frais est effectué à l'aide de pipettes stériles, et de telle manière qu'avec les espèces à croissance rapide, la concentration initiale soit environ 100 fois plus faible que celle de la « vieille » culture.

Le taux de croissance d'une espèce, qui peut être déterminé à partir de la courbe de croissance, permet d'estimer la densité à laquelle il convient de transférer la culture dans un nouveau milieu. Ceci doit être fait avant que la culture n'atteigne la phase létale.

Pré-culture :

La pré-culture sert à fournir une quantité d'algues appropriée pour l'inoculation des cultures d'essai. La pré-culture est incubée dans les conditions de l'essai et elle est utilisée alors qu'elle est encore en croissance exponentielle, généralement après une période d'incubation de trois jours environ. Il faut écarter les cultures d'algues qui contiennent des cellules déformées ou anormales.

Annexe 2

La norme ISO 8692—Qualité de l'eau—essai d'inhibition de la croissance des algues en eau douce effectué avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum* a permis d'obtenir les résultats suivants lors d'un essai inter-laboratoires portant sur le bichromate de potassium auquel ont participé 16 laboratoires :

	Moyenne (mg/l)	Intervalle (mg/l)
C _{Er50} (0-72 h)	0,84	de 0,60 à 1,03
C _{Eb50} (0-72 h)	0,53	de 0,20 à 0,75

C.4. DETERMINATION DE LA BIODEGRADABILITE « FACILE »

PARTIE I. GENERALITES

I.1. INTRODUCTION

Six méthodes d'essai permettant d'évaluer la biodégradabilité facile de produits chimiques en milieu aqueux en aérobiose sont décrites :

- Disparition du carbone organique dissout (COD) (Méthode C.4-A)
- Essai de screening modifié de l'OCDE — Disparition du COD — (Méthode C.4-B)
- Dégagement de dioxyde de carbone (CO₂) (Essai Sturm modifié) (Méthode C.4-C)
- Respirométrie manométrique (Méthode C.4-D)
- Fiole Fermée (Méthode C.4-E)
- MITI (Ministère de l'Industrie et du Commerce International — Japon) (Méthode C.4-F)

La Partie I contient des considérations d'ordre général ainsi que des considérations communes aux six essais. Les particularités propres à chaque méthode sont décrites dans les parties II à VII. Les annexes contiennent définitions, formules et données de référence.

Un exercice comparatif inter-laboratoires de l'OCDE, réalisé en 1988, a montré que ces méthodes donnent des résultats comparables. Toutefois, l'une ou l'autre de ces méthodes peut être préférable en fonction des caractéristiques physiques de la substance.

I.2. CHOIX DE LA METHODE APPROPRIEE

Il est essentiel, pour choisir la méthode la mieux appropriée, de disposer d'informations concernant la solubilité, la pression de vapeur et les caractéristiques d'adsorption de la substance à étudier. Pour calculer la valeur théorique et/ou vérifier les valeurs mesurées d'un paramètre tel que la DThO, le CO₂Th, le COD, le COT et la DCO (voir annexes I et II), il est nécessaire de connaître la structure chimique ou la formule brute du produit.

Toutes ces méthodes sont applicables aux substances d'essai qui peuvent être dissoutes dans l'eau à des concentrations de 100 mg/l au moins, pourvu qu'elles ne soient ni volatiles ni adsorbables. Dans le cas de produits peu hydrosolubles, volatiles ou adsorbables, les méthodes appropriées sont indiquées dans le tableau I. La manière de procéder avec les produits faiblement hydrosolubles et les substances volatiles est décrite à l'annexe III. Les substances modérément volatiles peuvent être étudiées à l'aide de la méthode de disparition du COD pourvu que les récipients d'essai contiennent un volume gazeux suffisant et qu'ils soient fermés de manière appropriée. Dans ce cas, un contrôle abiotique doit toutefois être prévu afin de tenir compte de toute perte physique.

Tableau 1: Limites d'application des méthodes d'essai

Essai	Méthode analytique	Approprié pour les substances qui sont:		
		faiblement solubles	volatiles	absorbantes
Disparition du COD	Carbone organique dissout	—	—	+ / -
Screening mod. OCDE	Carbone organique dissout	—	—	+ / -
Dégagement de CO ₂	Respirométrie: dégagement de CO ₂	+	—	+
Respirométrie manométrique	Respirométrie manométrique: consommation d'oxygène	+	+ / -	+
Fiole fermée	Respirométrie: oxygène dissout	+ / -	+	+
MITI	Respirométrie: consommation d'oxygène	+	+ / -	+

L'interprétation des résultats obtenus nécessite des informations sur la pureté de la substance à étudier ou sur les proportions relatives de ses principaux composants, en particulier lorsque ces résultats sont faibles ou marginaux.

Il peut être extrêmement utile de disposer d'informations sur la toxicité du produit à étudier vis-à-vis des bactéries (Annexe IV) pour choisir les concentrations d'essai appropriées et interpréter les résultats de biodégradation, notamment lorsque les valeurs sont peu élevées.

I.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

La procédure est contrôlée à l'aide de substances de référence répondant aux critères de biodégradabilité facile. Ces substances sont étudiées parallèlement aux substances d'essai en ajoutant une fiole appropriée à la série normale d'essais.

Les produits chimiques adéquats sont l'aniline (fraîchement distillée), l'acétate de sodium et le benzoate de sodium. Ces produits de référence sont tous dégradés dans les conditions de ces méthodes, même si aucun inoculum n'est délibérément ajouté.

Il avait été suggéré de retenir un produit de référence qui soit facilement biodégradable, mais qui nécessite l'addition d'un inoculum. L'hydrogène-phtalate de potassium a été proposé mais le bien-fondé de son utilisation reste à démontrer, avant de l'accepter comme substance de référence.

Dans le cas des essais respirométriques, les composés azotés peuvent influencer la consommation d'oxygène du fait de la nitrification (voir les annexes II et V).

I.4. PRINCIPE DES METHODES D'ESSAI

Une solution ou une suspension de la substance à étudier dans un milieu minéral estensemencée et incubée en aérobiose, dans l'obscurité ou sous lumière diffuse. La quantité de COD due à l'inoculum, présente dans la solution d'essai doit être aussi faible que possible par rapport à la quantité de COD provenant de la substance à étudier. L'activité endogène de l'inoculum est estimée en effectuant parallèlement des essais à blanc avec l'inoculum mais sans addition de substance à étudier, quoique l'activité endogène des cellules en présence de la substance ne correspond pas exactement à celle de ce contrôle endogène. Un essai avec une substance de référence est effectué en parallèle pour vérifier le fonctionnement de ces procédures.

La dégradation est en général suivie par la détermination de paramètres comme le COD, la production de CO₂ ou la consommation d'oxygène et les mesures sont effectuées avec une fréquence suffisante pour permettre l'identification du commencement et de la fin de la biodégradation. Les respiromètres automatiques permettent d'effectuer des mesures en continu. Le COD est parfois mesuré en plus d'un autre paramètre, mais ceci n'est généralement le cas qu'au début et à la fin de l'essai. Une analyse chimique spécifique peut également servir à évaluer la dégradation primaire de la substance à étudier et à déterminer la concentration de toutes les substances intermédiaires formées (obligatoire dans l'essai MITI).

L'essai dure normalement 28 jours. Un essai peut cependant être interrompu avant, dès lors que la courbe de biodégradation atteint un plateau qui se prolonge au moins sur trois mesures. Un essai peut également être prolongé au-delà de 28 jours si la courbe montre que la biodégradation a manifestement commencé sans toutefois avoir atteint un palier le 28^e jour.

I.5. CRITERES DE QUALITE

I.5.1. Reproductibilité

En raison de la nature de la biodégradation et de l'hétérogénéité des populations bactériennes utilisées comme inoculum, les mesures doivent être effectuées au moins en double.

On observe souvent que plus la concentration initiale des micro-organismes ajoutés au milieu d'essai est élevée, plus la variation entre les répétitions est faible. Des essais d'intercomparaison ont également montré que des variations importantes peuvent apparaître entre les résultats obtenus dans différents laboratoires, mais les résultats relatifs aux produits de référence facilement biodégradables sont généralement en bonne harmonie.

I.5.2. Validité de l'essai

Un essai est considéré comme valable si la différence entre les valeurs extrêmes en double de la mesure de la disparition du produit à étudier, au niveau du plateau, à la fin de l'essai ou à la fin de la fenêtre de 10 jours, est inférieure à 20 % et si le pourcentage de dégradation du produit de référence a atteint le niveau correspondant à une biodégradabilité facile en 14 jours. Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'essai devra être recommencé. En raison du caractère rigoureux de ces méthodes, 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 seulement que d'autres études seront nécessaires pour en faire la preuve.

Si, lors d'un essai de toxicité effectué avec une solution contenant à la fois la substance à étudier et un produit de référence, la dégradation est inférieure à 35 % (établie d'après le COD) ou à 25 % (établie d'après la DThO ou le CO₂Th) au cours des 14 premiers jours, on peut estimer que le produit a un effet inhibiteur (voir également l'annexe IV). La série d'essais doit être recommencée, si possible en utilisant une concentration de substance à étudier plus faible et/ou une concentration d'inoculum plus élevée, sans toutefois dépasser 30 mg/l de matière en suspension.

I.6. PROCEDURES ET PREPARATIONS GENERALES

Les conditions générales qui s'appliquent aux essais sont résumées dans le tableau 2. Les appareils et les conditions expérimentales spécifiques d'un essai particulier sont décrits ci-après dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Tableau 2: conditions d'essai

Essai	Disparition du COD	Dégagement de CO ₂	Respirométrie manométrique	Screening modifié de l'OCFD	Fiole fermée	MITI (I)
Concentration de la substance à étudier en: mg/l mg/l COD mg/l DThOD	10-40	10-20	100 10-40 50-100		2-10 5-10	100
Concentration de l'inoculum (approximative, en cellules/l)	≤ 1e; 30 mg/l MES ou ≤ 1e; 100 ml/l d'effluent (10 ⁷ - 10 ⁸)			0,5 ml/l d'effluent secondaire (10 ⁵)	jusqu'à 5 ml/l d'effluent (10 ⁴ - 10 ⁶)	30 mg/l MES (10 ⁷ - 10 ⁸)
Concentration d'éléments dans le milieu minéral (en mg/l): P N Na K Mg Ca Fe	116 1,3 86 122 2,2 9,9 0,05-0,1				11,6 0,13 8,6 12,2 2,2 9,9 0,05-0,1	29 1,3 17,2 36,5 6,6 29,7 0,15
pH	7,4 ± 0,2					de préférence 7,0
Température	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
COD = Carbone Organique Dissout		DThOD = Demande Théorique en Oxygène		MES = Matières en Suspension		

I.6.1. Eau de dilution

De l'eau déionisée ou distillée, exempte de substances toxiques à des concentrations inhibitrices (tels que des ions Cu⁺⁺), est utilisée. Elle ne contient pas plus de 10 % de la quantité de carbone organique introduite par la substance à étudier. L'eau d'essai doit être d'un haut degré de pureté afin d'éviter des valeurs élevées dans les essais à blanc. Des contaminations peuvent provenir non seulement des impuretés inhérentes mais également des résines échangeuses d'ions et de matières provenant de la lyse des bactéries et des algues. Pour chaque série d'essais, n'utiliser qu'un même lot d'eau dont la teneur en COD doit être analysée au préalable. Une telle analyse n'est pas nécessaire pour l'essai en fiole fermée, mais la consommation en oxygène à partir de l'eau doit être faible.

I.6.2. Solutions mères de sels minéraux

Les solutions de sels minéraux utilisées pour l'essai sont préparées à partir de solutions mères de concentration appropriée. Les solutions mères décrites ci-après peuvent être utilisées (avec différents facteurs de dilution) dans les méthodes de disparition du COD, de screening modifié de l'OCDE, de dégagement de CO₂, de respirométrie manométrique et dans l'essai en fiole fermée.

Les facteurs de dilution et, pour l'essai MITI, la préparation spécifique du milieu minéral sont mentionnés dans les chapitres consacrés à chaque essai.

Solutions mères :

Les solutions mères suivantes sont préparées en utilisant des réactifs de qualité analytique :

(a)	Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4	8,50 g
	Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4	21,75 g
	Monohydrogénophosphate de sodium dihydraté $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
	Chlorure d'ammonium, NH_4Cl	0,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre. Le pH de la solution doit être égal à 7,4.	
(b)	Chlorure de calcium, anhydre CaCl_2	27,50 g
	ou chlorure de calcium dihydraté, $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
(c)	Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	
(d)	Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
	Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre	

Note : Afin d'éviter d'avoir à préparer cette solution immédiatement avant usage, ajouter une goutte d'HCl concentré ou 0,4 g/l de sel disodique d'acide éthylènediaminotétra-acétique (EDTA).

I.6.3. Solutions mères de produits chimiques

Dissoudre, si la solubilité excède 1 g/l, par exemple, entre 1 et 10 g, selon les cas, de substance à étudier ou de substance de référence dans de l'eau déionisée et compléter le volume à 1 litre. Dans le cas contraire, préparer des solutions mères dans du milieu minéral ou ajouter directement le produit au milieu minéral. Dans le cas de substances de plus faible solubilité, se référer à l'annexe III, mais noter que, dans l'essai MITI (Méthode C.4-F), aucun solvant ni émulsifiant ne doit être utilisé.

I.6.4. Inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources : boues activées, effluents non chlorés, eaux de surface, sols, ou encore un mélange de ceux-ci. Pour les essais de disparition du COD, de dégagement de CO_2 et de respirométrie manométrique, si des boues activées sont utilisées, elles doivent provenir d'une station d'épuration ou d'une unité pilote traitant principalement des eaux ménagères. Il a été montré que les inoculum provenant d'autres sources donnent des résultats plus dispersés. Pour l'essai de screening modifié de l'OCDE et l'essai en fiole fermée, il convient d'utiliser un inoculum plus dilué ne contenant pas de floccs de boue et la source la plus appropriée consiste en un effluent secondaire d'une station d'épuration des eaux résiduaires urbaines ou d'une installation à l'échelle du laboratoire. Pour l'essai MITI, l'inoculum, qui provient d'un mélange de plusieurs origines, est décrit dans le chapitre consacré à cet essai.

I.6.4.1. Inoculum provenant de boues activées

Recueillir un échantillon de boue activée dans le compartiment d'aération d'une station d'épuration traitant des eaux résiduaires ou d'une installation à l'échelle du laboratoire traitant principalement les eaux ménagères. Éliminer, si nécessaire, les grosses particules par filtration à travers un tamis fin et conserver ensuite la boue en aérobiose.

Une autre possibilité consiste à laisser la boue sédimenter ou à la centrifuger (par exemple à 1 100 g pendant 10 mn) après avoir éliminé toutes les grosses particules. Écarter le surnageant. La boue peut être lavée dans le milieu minéral. Mettre la boue concentrée en suspension dans un milieu minéral de telle sorte que la concentration soit comprise entre 3 et 5 g/l de matière en suspension. Aérer la suspension jusqu'à son utilisation.

Les boues doivent provenir d'une station conventionnelle fonctionnant bien. Si elles proviennent d'une station d'épuration dont le débit est important ou si elles sont susceptibles de contenir des inhibiteurs, elles doivent être lavées. Laisser sédimenter ou centrifuger la boue remise en suspension par une agitation vigoureuse, écarter le surnageant et remettre la boue lavée en suspension dans un milieu minéral frais. Répéter cette opération jusqu'à ce que l'on puisse considérer que la boue est exempte d'inhibiteur et de substrat en excès.

Prélever un échantillon de boue remise en suspension ou de boue non traitée juste avant son utilisation afin de déterminer le poids sec des matières solides en suspension.

Une autre possibilité consiste à homogénéiser la boue activée (entre 3 et 5 g/l de matière solide en suspension) à l'aide d'un agitateur mécanique pendant 2 minutes à vitesse moyenne. Laisser décanter la boue homogénéisée pendant 30 minutes ou plus si besoin est, et prélever la phase liquide, qui sera utilisée comme inoculum à raison de 10 ml/l de milieu minéral.

I.6.4.2. Autres sources d'inoculum

L'inoculum peut provenir de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une installation à l'échelle du laboratoire qui reçoit principalement des eaux ménagères. Recueillir un échantillon frais qui doit être maintenu en aérobiose pendant le transport. Laisser reposer pendant une heure ou filtrer à l'aide d'un papier filtre grossier et conserver le surnageant transvasé ou le filtrat en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. On peut utiliser jusqu'à 100 ml de ce type d'inoculum par litre de milieu.

L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Dans ce cas, recueillir un échantillon d'une eau de surface appropriée, par exemple de rivière ou de lac, et le maintenir en aérobiose jusqu'au moment de son utilisation. Si nécessaire, concentrer l'inoculum par filtration ou par centrifugation.

I.6.5. Préconditionnement des inoculum

Les inoculum peuvent être preconditionnés aux conditions expérimentales, mais non pré-adaptés au produit à étudier. Le preconditionnement consiste à aérer la boue activée dans un milieu minéral, ou l'effluent secondaire pendant une durée de 5 à 7 jours à la température de l'essai. Le preconditionnement permet parfois d'améliorer la précision des méthodes d'essai en réduisant les valeurs dans les essais à blanc. Il est inutile de preconditionner les inoculum destinés à l'essai MITI.

I.6.6. Contrôles abiotiques

Rechercher, si nécessaire, une dégradation abiotique éventuelle de la substance à étudier en déterminant la disparition du COD, la consommation d'oxygène ou le dégagement de dioxyde de carbone dans des témoins stériles ne contenant pas d'inoculum. La stérilisation est effectuée par filtration à travers une membrane (0,2 à 0,45 µm) ou par addition d'une substance toxique adéquate à une concentration appropriée. Si la filtration sur membrane est utilisée, prélever les échantillons de façon aseptique pour maintenir la stérilité. A moins que l'adsorption de la substance à étudier ait pu être exclue a priori, des essais où la biodégradation est mesurée par l'élimination de COD doivent comporter, particulièrement lorsqu'il s'agit d'inoculum provenant de boues activées, un témoin abiotique qui sera inoculé et additionné de l'agent stérilisant.

I.6.7. Nombre de fioles

Le nombre de fioles d'une série type est précisé dans les chapitres consacrés à ces essais.

Des fioles de type suivant peuvent être utilisées :

pour la suspension d'essai :	contenant la substance à étudier et l'inoculum
pour le blanc inoculum :	ne contenant que l'inoculum
pour le contrôle de la procédure :	contenant la substance de référence et l'inoculum
pour le témoin abiotique stérile :	stérile et ne contenant que le produit à étudier
pour le contrôle de l'adsorption :	contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant
pour le contrôle de toxicité :	contenant le produit à étudier, le produit de référence et l'inoculum.

Il est obligatoire de suivre le COD et/ou les autres paramètres parallèlement dans la suspension d'essai et dans l'essai à blanc contenant l'inoculum. Il est souhaitable de suivre également le COD en parallèle dans les autres fioles.

Toutefois, il se peut que ceci ne soit pas toujours possible. S'assurer que le nombre d'échantillons ou de lectures est suffisant pour permettre de déterminer le pourcentage de disparition au cours de l'intervalle de temps de 10 Jours.

I.7. EVALUATION DES DONNEES

Le pourcentage de dégradation, D_t , est calculé à l'aide des valeurs moyennes des doubles déterminations du paramètre dans le récipient d'essai et dans le blanc contenant l'inoculum. Les formules sont décrites dans les chapitres consacrés à chaque essai. L'évolution de la dégradation est représentée graphiquement sur un diagramme indiquant l'intervalle de temps de 10 jours. Calculer et mentionner dans le rapport le pourcentage de disparition au terme de l'intervalle de temps de 10 jours et la valeur obtenue au plateau ou à la fin de l'essai, selon les cas

Dans les essais de respirométrie, des composés contenant de l'azote peuvent affecter la consommation d'oxygène en raison de la nitrification (voir Annexes II et V).

I.7.1. Estimation de la dégradation à l'aide de la détermination du COD

Pour pouvoir vérifier la validité de l'essai (voir 1.5.2), le pourcentage de dégradation (D_t) à chaque instant t de prise d'un échantillon doit être calculé séparément pour les fioles contenant la substance à étudier en utilisant les valeurs moyennes de mesures en double du COD. Il se calcule à l'aide de la formule suivante :

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t ,

C_o = concentration initiale moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à étudier (mg COD/l),

C_t = concentration moyenne de COD dans le milieu de cultureensemencé contenant la substance à étudier, au temps t (mg COD/l),

C_{bo} = concentration initiale moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéralensemencé) (mg COD/l),

C_{bt} = concentration moyenne de COD dans l'essai à blanc (milieu minéralensemencé) au temps t (mg COD/l).

Toutes les concentrations sont mesurées expérimentalement.

I.7.2. Estimation de la dégradation à l'aide d'analyses spécifiques

Lorsque l'on dispose de données analytiques spécifiques, la biodégradation primaire est calculée grâce à la formule suivante :

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

où:

D_t = % de dégradation au temps t , soit normalement le 28ème jour,

S_a = quantité résiduelle de produit soumis à l'essai dans le milieuensemencé à l'issue de l'essai (mg),

S_b = quantité résiduelle de produit à étudier dans l'essai à blanc constitué d'eau/milieu auquel on aura uniquement ajouté le produit à étudier (mg).

I.7.3. Dégradation abiotique

Lorsqu'on utilise un témoin abiotique stérile, le pourcentage de dégradation abiotique se calcule par la formule :

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

où:

$C_{s(0)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps 0,

$C_{s(t)}$ = concentration en COD dans le témoin stérile au temps t.

I.8. RAPPORT

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

- produits à étudier et produits de référence ainsi que leur degré de pureté;
- conditions de l'essai;
- inoculum : nature et lieu(x) de prélèvement, concentration ainsi que tout traitement de préconditionnement;
- proportion et nature des déchets industriels présents dans les eaux d'égout, si elles sont connues;
- durée et température de l'essai;
- dans le cas où les produits à étudier sont faiblement solubles, le traitement appliqué;
- méthode d'essai appliquée; il convient de fournir les raisons scientifiques et l'explication de toute modification du mode opératoire;
- fiche de données;
- tout phénomène d'inhibition observé;
- toute dégradation abiotique observée;
- les données concernant les analyses chimiques spécifiques, si elles sont disponibles;
- les données concernant les analyses de substances intermédiaires, si elles sont disponibles;
- la courbe représentant le pourcentage de dégradation en fonction du temps pour les substances soumises à l'essai et les substances de référence; la phase de latence, la phase de dégradation, l'intervalle de temps de 10 jours et la pente doivent être clairement indiqués (Annexe 1). Si l'essai a satisfait les critères de validité, on peut utiliser la moyenne des pourcentages de dégradation des fioles contenant la substance à étudier pour la courbe;
- le pourcentage de disparition à l'issue de l'intervalle de temps de 10 jours et au plateau ou à la fin de l'essai.

PARTIE II. ESSAI DE DISPARITION DU COD (Méthode C.4.-A)**II.1. PRINCIPE DE LA METHODE**

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de substance à étudier (10 à 40 mg/l de COD) comme seule source de carbone organique, est aéré dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse, à 22 ± 2 °C.

La dégradation est suivie en analysant le COD à des intervalles fréquents pendant une durée de 28 jours. Le degré de biodégradation est calculé en exprimant la concentration de COD disparu (à laquelle on apportera une correction correspondant à la concentration de COD disparu dans l'essai à blanc contenant l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de biodégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

II.2. DESCRIPTION DE LA METHODE**II.2.1. Appareillage**

- a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 l, selon le volume requis pour l'analyse du COD;
- b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles;
- c) un dispositif de filtration équipé des membranes adéquates;
- d) un analyseur du carbone organique dissous;
- e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous;
- f) une centrifugeuse.

II.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation de la solution mère, voir 1.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

II.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources : boues activées, effluents, eaux de surface, sols ou d'un mélange de celles-ci.

Voir I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. et I.6.5.

II.2.4. Préparation des fioles

Exemple : verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 l et ajouter dans des fioles distinctes un volume suffisant de solution mère de substance d'essai ou de substance de référence pour que la concentration de la substance corresponde à une concentration en COD comprise entre 10 et 40 mg/l. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les flacons avec de la boue activée ou avec un inoculum provenant d'une autre source (voir 1.6.4.), de telle sorte que la concentration finale n'excède pas 30 mg/l de matière solide en suspension. Préparer également des témoins constitués de milieu minéral contenant l'inoculum mais sans substance d'essai ni substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour la détection d'un éventuel effet inhibiteur de la substance d'essai. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations, à la fois de produit à étudier et de produit de référence, identiques à celles des autres fioles.

Ajouter, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemencée afin de vérifier si la substance soumise à l'essai subit une dégradation abiotique (voir 1.6.6.).

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant d'évaluer l'importance probable de cette adsorption et par conséquent de déterminer si l'essai convient pour la substance concernée (voir Tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque fiole afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir Annexe II.4). Couvrir l'ouverture des fioles, par exemple avec du papier d'aluminium, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les fioles dans le dispositif d'agitation.

II.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2 : suspension d'essai

Fioles 3 et 4 : blanc inoculum

Fiole 5 : contrôle de la procédure et de préférence et si nécessaire :

Fiole 6 : témoin abiotique stérile

Fiole 7 : contrôle de l'adsorption

Fiole 8 : témoin de toxicité

Voir également 1.6.7.

II.2.6. Déroulement de l'essai

Pendant l'essai, les concentrations de COD font l'objet de doubles déterminations à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume de suspension d'essai strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant, compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (1.6.1.). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois du récipient doivent être dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4); ils sont analysés le jour même; si tel n'est pas le cas il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de - 18 °C au-delà de 48 heures.

II.3. RESULTATS ET RAPPORT

II.3.1. Traitement des résultats

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t, selon les indications figurant au paragraphe 1.7.1. (détermination du COD) et, éventuellement, au paragraphe 1.7.2. (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

II.3.2. Validité des résultats

Voir 1.5.2.

II.3.3. Rapport

Voir 1.8.

II.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est fourni ci-dessous.

ESSAI DE DISPARITION DU COD

1. LABORATOIRE

2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI

3. SUBSTANCE A ETUDIER

Nom :

Concentration de la solution mère : ...mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_0 : mg/l produit

4. INOCULUM

Origine :

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel : mg/l

5. DETERMINATION DU CARBONE

Analyseur de carbone:

	Fiole n°		COD après n jours (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Substance à étudier plus inoculum	1	a_1					
		a_2					
		a, moyenne $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, moyenne $C_{b(t)}$					
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	c_1					
		c_2					
		c, moyenne $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, moyenne $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_a(t) - C_{bl}(t)}{C_a(o) - C_{bl}(o)}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_b(t) - C_{bl}(t)}{C_b(o) - C_{bl}(o)}\right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Lorsque la différence entre les valeurs de D₁ et D₂ est trop grande, il ne faut pas calculer leur moyenne.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. CONTRÔLE ABIOTIQUE (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Conc. de COD (mg/l) dans le témoin stérile	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S _b	✓
Milieu d'essai contaminé	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE III. ESSAI DE SCREENING MODIFIÉ DE L'OCDE (Méthode C.4-B)

III.1. PRINCIPE DE LA METHODE

Un volume mesuré de milieu minéral contenant une concentration connue de substance à étudier (de 10 à 40 mg/l COD) comme unique source de carbone organique, est ensemencé avec un volume de 0,5 ml d'effluent par litre de milieu. Le mélange est aéré à 22 ± 2 °C dans l'obscurité ou sous une lumière diffuse.

La dégradation est suivie grâce à l'analyse du COD à des intervalles rapprochés pendant une période de 28 jours. Le taux de biodégradation est calculé en exprimant la concentration en COD disparu (corrigé en fonction de la quantité de COD disparu dans l'essai à blanc avec l'inoculum) en pourcentage de la concentration initiale. Le taux de dégradation primaire peut également être calculé à partir d'analyses chimiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation.

III.2. DESCRIPTION DE LA METHODE

III.2.1. Appareillage

a) des fioles coniques, d'une contenance comprise, par exemple, entre 250 ml et 2 l, selon le volume requis pour l'analyse du COD,

b) un dispositif d'agitation adapté aux fioles coniques, soit muni d'un système automatique de contrôle de température, soit placé dans une pièce thermostatée, et permettant de maintenir des conditions d'aérobiose dans toutes les fioles,

c) un appareillage de filtration, accompagné des membranes adéquates,

d) un analyseur du carbone organique dissous,

e) un appareil de mesure de l'oxygène dissous,

f) une centrifugeuse.

III.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation de la solution mère, voir 1.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) avec 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec de l'eau de dilution.

Cette méthode ne nécessitant que 0,5 ml/l d'effluent comme inoculum, le milieu doit par conséquent être enrichi en oligo-éléments et facteurs de croissance. On ajoute pour cela 1 ml de chacune des solutions ci-après par litre de milieu final.

Solution d'oligo-éléments :

Sulfate de manganèse tétrahydraté, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 39,9 mg

Acide borique, H_3BO_3 57,2 mg

Sulfate de zinc heptahydraté, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 42,8 mg

Heptamolybdate d'ammonium, $(NH_4)_6 MO_7 O_{24}$ 34,7 mg

Fer-chélaté, ($FeCl_3$, EDTA) 100,0 mg

Dissoudre et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

Solution de vitamines :

Extrait de levure 15,0 mg

Dissoudre l'extrait de levure dans 100 ml d'eau. Stériliser par passage à travers une membrane de porosité 0,2 μm ou préparer une solution fraîche.

III.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit essentiellement des eaux ménagères. Voir I.6.4.2. et I.6.5.

On en utilise 0,5 ml par litre de milieu minéral.

III.2.4. Préparation des fioles

Exemple : verser un volume de 800 ml de milieu minéral par fiole conique de 2 l et ajouter dans des fioles distinctes des volumes de solution mère de substance à étudier et de substance de référence tels que la concentration du produit soit comprise entre 10 et 40 mg/l de COD. Vérifier le pH et l'ajuster, si nécessaire, à une valeur de 7,4. Ensemencer les fioles avec un volume de 0,5 ml/l d'effluent d'eau d'égout (voir 1.6.4.2.). Préparer également des témoins en ajoutant l'inoculum au milieu minéral, mais sans addition de substance d'essai ou de substance de référence.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemencer une solution contenant des concentrations de produit à étudier et de produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire, stérile, contenant une solution de substance non ensemencée afin de vérifier si la substance à étudier subit une dégradation abiotique (voir 1.6.6.).

De surcroît, si le produit à étudier est suspecté de s'adsorber de manière importante sur le verre, la boue, etc., il convient d'effectuer des mesures préliminaires permettant de déterminer l'importance vraisemblable de l'adsorption et d'évaluer par conséquent si l'essai convient pour la substance concernée (voir Tableau 1). Préparer une fiole contenant la substance à étudier, l'inoculum et l'agent stérilisant.

Compléter le volume à 1 l dans toutes les fioles, avec le milieu minéral, mélanger, puis prélever un échantillon dans chaque flacon afin de déterminer la concentration initiale de COD (voir Annexe II.4). Recouvrir les fioles avec une feuille d'aluminium, par exemple, de telle sorte que les échanges gazeux puissent s'effectuer librement entre la fiole et l'atmosphère environnante. Commencer ensuite l'essai en plaçant les récipients dans le dispositif d'agitation.

III.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2 : suspension d'essai

Fioles 3 et 4 : blanc inoculum

Fiole 5 : contrôle de la procédure

et de préférence et si besoin est :

Fiole 6 : témoin abiotique stérile

Fiole 7 : contrôle de l'adsorption

Fiole 8 : témoin de toxicité

Voir également 1.6.7.

III.2.6. Déroulement de l'essai

Au cours de l'essai, les concentrations de COD dans chaque fiole font l'objet d'une double détermination à des intervalles de temps définis, suffisamment fréquents pour permettre de déterminer le début de l'intervalle de temps de 10 jours et le pourcentage de disparition au terme de cette période. Pour chaque détermination, il ne faut prélever que le volume strictement nécessaire.

Avant chaque prélèvement, le cas échéant compenser les pertes dues à l'évaporation dans les fioles par ajout de la quantité nécessaire d'eau de dilution (1.6.1.). Avant de prélever un échantillon, le milieu de culture est soigneusement mélangé et les substances adhérant aux parois des récipients sont dissoutes ou mises en suspension. Les échantillons sont immédiatement filtrés à travers une membrane ou centrifugés (voir annexe II.4). Ils sont analysés le jour même, si tel n'est pas le cas il faut les conserver entre 2 et 4 °C pendant un maximum de 48 heures, ou au-dessous de - 18 °C au-delà de 48 heures.

III.3. RESULTATS ET RAPPORT

III.3.1. **Traitement des résultats**

Calculer le pourcentage de dégradation au temps t , selon les indications figurant au paragraphe 1.7.1. (détermination du COD) et, éventuellement, au paragraphe 1.7.2. (analyse spécifique facultative).

Reporter tous les résultats sur les fiches de données fournies.

III.3.2. **Validité des résultats**

Voir 1.5.2.

III.3.3. **Rapport**

Voir 1.8.

III.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE TRIAGE DE L'OCDE MODIFIE

1. **LABORATOIRE**2. **DATE DU DEBUT DE L'ESSAI**3. **SUBSTANCE A ETUDIER**

Nom :

Concentration de la solution mère : mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu, t_0 : mg/l produit

4. **INOCULUM**

Origine :

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel : mg/l

5. **DETERMINATION DU CARBONE**

Analyseur de carbone :

	Fiole n°		COD après n jours (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Substance à étudier plus inoculum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, moyenne C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, moyenne C _{b(t)}					
Essai à blanc avec l'inoculum et sans substance à étudier	3	c ₁					
		c ₂					
		c, moyenne C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, moyenne C _{d(t)}					
$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$							

6. ÉVALUATION DES DONNÉES BRUTES

Fiole n°		% de dégradat. après n jours				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
Moyenne (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) Il ne faut pas calculer la moyenne de D₁ et D₂ lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux similaires peuvent être utilisés pour les produits de référence et les témoins de toxicité.

7. CONTRÔLE ABIOTIQUE (facultatif)

	Durée (en jours)	
	0	t
Conc. de COD (mg/l) dans le témoin stérile	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

	quantité résiduelle de substance à étudier à la fin de l'essai	% de dégradation primaire
Témoin stérile	S _b	
Milieu d'essai contaminé	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

PARTIE IV. ESSAI DE DEGAGEMENT DE CO₂ (Méthode C.4-C)

IV.1. PRINCIPE DE LA METHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance à étudier (correspondant à 10 à 20 mg/l de COD ou de COT) comme seule source de carbone organique, est aéré par le passage d'air exempt de dioxyde de carbone, à un débit contrôlé et dans l'obscurité ou en lumière diffuse. La dégradation est suivie pendant une durée de 28 jours en déterminant le dioxyde de carbone produit, qui est piégé par de l'hydroxyde de sodium ou de baryum et mesuré par titration de l'hydroxyde résiduel ou en tant que carbone inorganique. La quantité de dioxyde de carbone produite à partir de la substance à étudier (corrigée en fonction de la quantité produite dans l'essai à blanc avec l'inoculum) est exprimée en pourcentage du CO₂Th. Le taux de biodégradation peut également être calculé à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation.

IV.2. DESCRIPTION DE LA METHODE

IV.2.1. Appareillage

a) des fioles d'une contenance de 2 à 5 litres, munies d'un tube d'aération atteignant presque le fond du récipient et d'un orifice de sortie;

b) des agitateurs magnétiques pour les essais avec des substances peu solubles;

- c) des flacons absorbeurs de gaz;
- d) un dispositif de contrôle et de mesure du débit d'air;
- e) un appareil de lavage du dioxyde de carbone, permettant d'obtenir de l'air exempt de dioxyde de carbone; une autre possibilité consiste à utiliser un mélange d'oxygène et d'azote exempts de CO₂, provenant de bouteilles de gaz, dans des proportions adéquates (20 % O₂, 80 % N₂);
- f) un dispositif de mesure du dioxyde de carbone, soit par titrimétrie, soit à l'aide d'un analyseur de carbone inorganique quelconque;
- g) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif);
- h) un analyseur de COD (facultatif).

IV.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation des solutions mères, voir 1.6.2.

Mélanger 10 ml de solution a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions b) à d) et compléter le volume à 1 l avec l'eau de dilution.

IV.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources : boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir 1.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. et 1.6.5.

IV.2.4. Préparation des fioles

Les volumes et poids cités ci-après à titre d'exemple indiquent des valeurs correspondant à des fioles de 5 l contenant 3 l de suspension. Si de plus petits volumes sont utilisés, il convient de modifier les valeurs en conséquence, mais en s'assurant que le dioxyde de carbone formé peut être mesuré avec précision.

Verser 2 400 ml de milieu minéral dans chaque fiole de 5 l. Ajouter un volume approprié de boue activée préparée au préalable (voir 1.6.4.1. et 1.6.5.) tel que la concentration des matières en suspension n'excède pas 30 mg/l dans le volume final de 3 l de mélangeensemencé. Une autre possibilité consiste à diluer d'abord la boue préparée jusqu'à obtention d'une suspension de 500 à 1000 mg/l dans le milieu minéral, puis à ajouter une partie aliquote de cette suspension dans la fiole de 5 l, de manière à atteindre une concentration de 30 mg/l; cette méthode permet une plus grande précision. On peut utiliser des inoculum d'origines différentes (voir 1.6.4.2.).

Éliminer le dioxyde de carbone du mélangeensemencé par barbotage d'air exempt de CO₂, pendant une nuit.

Ajouter séparément des volumes connus de solutions mères de la substance d'essai et de la substance de référence dans des fioles préparées en double, de telle sorte que la concentration de COD ou de COT, provenant des substances ajoutées, soit comprise entre 10 et 20 mg/l; conserver quelques fioles sans addition de substance comme témoins d'ensemencement. Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les indications données à l'Annexe III.

Ajouter, si nécessaire, une fiole pour mesurer un éventuel effet inhibiteur de la substance à étudier. Pour cela, ensemenecer une solution contenant des concentrations du produit à étudier et du produit de référence identiques à celles des autres fioles.

Ajouter également, si besoin est, une fiole supplémentaire stérile, contenant une solution de produit non ensemenecée afin de vérifier si la substance d'essai subit une dégradation abiotique (voir 1.6.6.). Stériliser par addition d'une substance toxique à une concentration appropriée.

Compléter le volume des suspensions à 3 litres, dans toutes les fioles, avec le milieu minéral aéré au préalable au moyen d'air exempt de CO₂. Des échantillons peuvent (facultatif) être prélevés afin d'analyser le COD (voir annexe II.4.) et/ou d'effectuer une analyse spécifique. Relier les flacons absorbeurs à l'orifice de sortie d'air des fioles.

Si l'on utilise de l'hydroxyde de baryum, à chacune des fioles de 5 litres, relier en série trois flacons absorbeurs, contenant chacun 100 ml d'une solution 0,0125 M d'hydroxyde de baryum. La solution ne doit contenir ni sulfate ni carbonate précipité et il convient d'en déterminer la teneur juste avant son utilisation. Si l'on utilise de l'hydroxyde de sodium, relier deux pièges, le second servant de contrôle pour montrer que tout le dioxyde de carbone a été absorbé dans le premier. On pourra utiliser des flacons absorbeurs munis de systèmes de fermeture pour flacons de sérum. Ajouter dans chaque flacon 200 ml d'hydroxyde de sodium 0,05 M, ce qui suffit à absorber la totalité du dioxyde de carbone dégagé lors de la dégradation complète de la substance à étudier. La solution d'hydroxyde de sodium, même fraîchement préparée, contiendra des traces de carbonate; il convient donc d'effectuer une correction en déduisant la quantité de carbonate présente dans le témoin.

IV.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2 : suspension d'essai

Fioles 3 et 4 : blanc inoculum

Fiole 5 : contrôle de la procédure

et de préférence et si nécessaire :

Fiole 6 : témoin abiotique stérile

Fiole 7 : témoin de toxicité

Voir également 1.6.7.

IV.2.6. Déroulement de l'essai

Commencer l'essai en faisant barboter de l'air exempt de CO₂ dans les suspensions à un débit de 30-100 ml/min. Prélever régulièrement des échantillons de l'absorbant de dioxyde de carbone pour en analyser la teneur en CO₂. Il est conseillé d'effectuer des analyses tous les deux ou trois jours pendant les dix premiers jours, puis ensuite tous les cinq jours jusqu'au 28e jour de telle sorte que l'intervalle de temps de 10 jours puisse être identifié.

Le 28e jour, prélever des échantillons (facultatif) pour analyser le COD et/ou effectuer une analyse spécifique, mesurer le pH des suspensions et ajouter 1 ml d'acide chlorhydrique concentré à chaque fiole; aérer la fiole pendant une nuit pour éliminer le dioxyde de carbone présent dans la suspension d'essai. Le 29e jour, analyser pour la dernière fois le dégagement de dioxyde de carbone.

Les jours où l'on effectue les mesures de CO₂, détacher le flacon absorbeur contenant de l'hydroxyde de baryum le plus proche de la fiole d'essai et titrer la solution d'hydroxyde de baryum à l'aide d'HCl 0,05 M en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur. Rapprocher les autres flacons absorbeurs en les décalant d'une place et introduire un nouveau flacon absorbeur contenant 100 ml d'hydroxyde de baryum 0,0125 M frais à l'extrémité de la série. Effectuer les titrations nécessaires, par exemple lorsqu'une précipitation importante se produit dans le premier piège et avant

qu'elle n'apparaisse dans le second, ou au moins une fois par semaine. Une autre possibilité consiste à utiliser le NaOH comme absorbant et à prélever à l'aide d'une seringue un échantillon de faible volume (en fonction du type d'analyseur de carbone utilisé) de la solution d'hydroxyde de sodium qui se trouve dans le flacon absorbeur le plus proche de la fiole. Injecter l'échantillon dans la partie CI de l'analyseur de carbone pour analyser directement le dioxyde de carbone dégagé.

N'analyser le contenu du second piège qu'à la fin de l'essai afin d'apporter une correction correspondant à tout passage de dioxyde de carbone dans ce piège.

IV.3. RESULTATS ET RAPPORT

IV.3.1. Traitement des résultats

Lorsqu'une titration est effectuée, la quantité de CO₂ piégée dans un flacon absorbeur est calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\text{mg CO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

où:

V = volume de HCl utilisé pour la titration des 100 ml contenus dans le flacon absorbeur (ml),

C_B = concentration de la solution d'hydroxyde de baryum (M),

C_A = concentration de la solution d'acide chlorhydrique (M),

si C_B est 0,0125 M et C_A 0,05 M, la titration d'un volume de 100 ml d'hydroxyde de baryum est de 50 ml et le poids de CO₂ est donné par la formule suivante:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml d'HCl titré} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Ainsi, dans ce cas, le facteur permettant de convertir le volume d'HCl titré en mg de CO₂ est égal à 1,1.

Calculer le poids de CO₂ produit par l'inoculum seul et par l'inoculum plus la substance à étudier à l'aide des valeurs de titration obtenues dans les deux cas; la différence correspond au poids de CO₂ produit à partir de la substance à étudier seule.

Exemple: si la titration du flacon absorbeur correspondant à l'inoculum seul nécessite un volume de 48 ml et celui du flacon correspondant à l'inoculum additionné à la substance, un volume de 45 ml:

$$\text{CO}_2 \text{ de l'inoculum} = 1,1 \times (50-48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ de l'inoculum plus substance à étudier} = 1,1 \times (50-45) = 5,5 \text{ mg}$$

et par conséquent le poids de CO₂ produit à partir de la substance à étudier est égal à 3,3 mg.

Le pourcentage de dégradation est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg CO}_2 \text{ produit} \times 100}{\text{CO}_2\text{Th} \times \text{mg substance à étudier ajoutée}}$$

ou

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{\text{mg de CO}_2 \times 100}{\text{mg de COT ajouté dans l'essai} \times 3,67}$$

où 3,67 est le facteur de conversion (44/12) du carbone en dioxyde de carbone.

Calculer le pourcentage de dégradation après un temps déterminé en effectuant la somme des pourcentages de CO₂Th calculés pour chaque jour où des mesures ont été effectuées pendant la période considérée.

Lorsque l'absorbant utilisé est de l'hydroxyde de sodium, calculer la quantité de dioxyde de carbone produite, exprimée en Cl (mg), en multipliant la concentration en Cl dans l'absorbant par le volume de ce dernier.

Calculer le pourcentage de dégradation à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ CO}_2\text{Th} = \frac{\text{mg Cl de la fiole d'essai} - \text{mg Cl de la fiole témoin}}{\text{mg de COT ajouté sous forme de substance d'essai}} \times 100$$

Calculer la disparition du COD (facultatif) comme décrit au paragraphe 1.7. Consigner ces résultats, ainsi que tout autre résultat, sur les fiches de données fournies.

IV.3.2. Validité des résultats

La teneur en Cl de la suspension de substance à étudier en milieu minéral au début de l'essai doit être inférieure à 5 % du CT, et le dégagement total de CO₂ dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit normalement pas excéder 40 mg/l de milieu à la fin de l'essai. Si les valeurs obtenues sont supérieures à 70 mg/l de CO₂, les données et le protocole expérimental doivent être soumis à un examen critique.

Voir également 1.5.2.

IV.3.3. Rapport

Voir 1.8.

IV.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI DE DEGAGEMENT DE DIOXYDE DE CARBONE**1. LABORATOIRE****2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI****3. SUBSTANCE A ETUDIER**

Nom :

Concentration de la solution mère : mg/l produit

Concentration initiale dans le milieu : mg/l produit

Carbone total ajouté dans la fiole : mg/l

CO₂Th : mg CO₂

4. INOCULUM

Origine :

Traitement :

Préconditionnement éventuel :

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel : mg/l

5. PRODUCTION DE DIOXYDE DE CARBONE ET DÉGRADABILITÉ

Méthode: Ba(OH)₂NaOH/ autre

Temps (jours)	CO ₂ formé Essai (mg)		CO ₂ formé blanc (mg)		CO ₂ formé cumulé (mg) (essai moins blanc)		% CO ₂ Th $\frac{\text{CO}_2 \text{ cumulé}}{\text{CO}_2\text{Th}} \times 100$		
	1 2	moy.	3 4	moy.	1	2	1	2	moy.
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. DÉTERMINATION DU CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jours)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) ou à la fin de l'incubation		

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultative)

$$\% \text{ dégrad. abiot.} = \frac{\text{Format. de CO}_2 \text{ d. la fiole stérile ap. 28 jours (mg)}}{\text{CO}_2\text{Th (mg)}} \times 100$$

PARTIE V. ESSAI DE RESPIROMETRIE MANOMETRIQUE (Méthode C.4-D)

VI. PRINCIPE DE LA METHODE

Un volume mesuré de milieu minéral ensemencé, contenant une concentration connue de la substance d'essai (100 mg/l de substance d'essai, de telle sorte que la DThO soit au moins comprise entre 50 et 100 mg/l au moins) comme seule source de carbone organique, est agité en fiole fermée, à température constante (± 1 °C au maximum) pendant une durée maximale de 28 jours. La consommation d'oxygène est déterminée soit en mesurant la quantité d'oxygène (produit par électrolyse) nécessaire pour maintenir un volume gazeux constant dans la fiole respirométrique, soit en se basant sur les modifications de volume ou de pression (ou sur une combinaison des deux) dans l'appareil. Le dioxyde de carbone produit est absorbé par une solution d'hydroxyde de potassium ou par un autre absorbant approprié. La quantité d'oxygène consommée par la substance à étudier (après une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par le témoin inoculum, analysée parallèlement) est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO. Facultativement, la biodégradation primaire peut également être calculée à partir d'analyses supplémentaires du COD effectuées au début et à la fin de l'incubation, et la biodégradation ultime par la mesure du COD.

V.2. DESCRIPTION DE LA METHODE

V.2.1. Appareillage

- (a) un respiromètre approprié,
- (b) un dispositif de régulation de température d'une précision de ± 1 °C au moins,
- (c) un dispositif de filtration sur membrane (facultatif),
- (d) un analyseur de carbone (facultatif).

V.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation des solutions mères, voir 1.6.2.

Mélanger 10 ml de solution (a) et 800 ml d'eau de dilution, ajouter 1 ml des solutions (b) à (d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

V.2.3. Préparation et préconditionnement de l'inoculum

L'inoculum peut provenir de plusieurs sources : boues activées — effluents — eaux de surface — sols — ou d'un mélange de celles-ci.

Voir 1.6.4., 1.6.4.1., 1.6.4.2. et 1.6.5.

V.2.4. Préparation des fioles

A partir des solutions mères, préparer différents lots de solutions de substance d'essai et de substance de référence dans du milieu minéral, normalement à une concentration de 100 mg/l de substance (ce qui donne une DThO comprise, au moins, entre 50 et 100 mg/l).

Calculer la DThO à partir de la formation de sels d'ammonium, à moins qu'un processus de nitrification ne soit prévisible, auquel cas le calcul reposera sur la formation de nitrate (voir annexe II.2.)

Mesurer le pH et, le cas échéant, l'ajuster à $7,4 \pm 0,2$.

Les substances faiblement solubles doivent être ajoutées lors d'une étape ultérieure (voir ci-après).

S'il convient de déterminer la toxicité de la substance à étudier, préparer une solution de milieu minéral supplémentaire contenant à la fois la substance de référence et le produit à étudier aux mêmes concentrations que dans les solutions ne contenant que l'un des produits.

Dans le cas où il est nécessaire de mesurer la consommation physico-chimique d'oxygène, préparer une solution de produit à étudier, dont la concentration corresponde normalement à une DThO de 100 mg/l, stérilisée par l'addition d'une substance toxique appropriée (voir 1.6.6.).

Ajouter dans deux fioles, au moins, le volume requis de solution d'essai et dans deux autres, au moins, le volume adéquat de solution de référence. Préparer d'autres fioles ne contenant que du milieu minéral (pour les témoins inoculum) et, le cas échéant, la solution de mélange produit à étudier/substance de référence et la solution stérile.

Si la substance à étudier est peu soluble, en ajouter un poids ou un volume déterminé, directement à ce stade, ou suivre le mode opératoire décrit à l'annexe III. Ajouter de l'hydroxyde de potassium, de la chaux sodée ou un autre absorbant dans les compartiments d'absorption du CO_2 .

V.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Fioles 1 et 2 : suspension d'essai

Fioles 3 et 4 : blanc inoculum

Fiole 5 : contrôle de la procédure

de préférence, et si nécessaire :

Fiole 6 : témoin stérile

Fiole 7 : témoin de toxicité

voir également 1.6.7.

V.2.6. Déroulement de l'essai

Laisser les récipients atteindre la température souhaitée. Ensemencer les récipients appropriés avec les boues activées préparées au préalable ou avec un inoculum provenant d'une autre source, de telle sorte que la concentration des matières solides en suspension ne dépasse pas 30 mg/l. Assembler le matériel, mettre l'agitateur en marche, vérifier l'étanchéité à l'air et commencer à mesurer la consommation d'oxygène. Le déroulement de l'essai ne nécessite normalement aucune attention particulière en dehors des lectures et des vérifications quotidiennes permettant de s'assurer que la température et l'agitation appropriées sont maintenues.

Calculer la consommation d'oxygène à partir des lectures effectuées à intervalles réguliers et rapprochés en suivant la méthode fournie par le fabriquant du matériel utilisé. A la fin de l'incubation, qui est normalement de 28 jours, mesurer le pH dans les fioles, en particulier si la consommation d'oxygène est faible ou supérieure à la $\text{DThO}_{\text{NH}_4}$ (pour les composés azotés).

Prélever, si nécessaire, des échantillons dans les fioles du respiromètre, au début et à la fin de l'essai, pour analyser le COD ou effectuer un dosage spécifique (voir annexe II.4.). Lors du premier prélèvement, noter le volume de suspension d'essai restant dans la fiole. Si la substance à étudier contient de l'azote, déterminer l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de ces 28 jours et calculer la correction relative à la consommation d'oxygène due à la nitrification (annexe V).

V.3. RESULTATS ET RAPPORT

V.3.1. Traitement des résultats

Diviser la consommation d'oxygène (mg) de la substance à étudier après une période donnée (après correction due à l'oxygène consommé dans l'essai à blanc contenant l'inoculum pendant une période identique) par le poids de substance utilisé. Le résultat, exprimé en mg d'oxygène par mg de substance, correspond à la DBO, à savoir :

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg d'O}_2 \text{ consom. par le produit à étudier} - \text{mg O}_2 \text{ consom. par le blanc}}{\text{mg de produit à étudier présent dans la fiole}}$$

$$= \text{mg d'O}_2 \text{ par mg de produit à étudier}$$

Calculer le pourcentage de biodégradation, soit à partir de la formule suivante:

$$\% \text{ de biodégrad.} = \% \text{ DThO} = \frac{\text{DBO (mg O}_2/\text{mg substance)}}{\text{DThO (mg O}_2/\text{mg substance)}} \times 100,$$

soit à l'aide de celle-ci:

$$\% \text{ DCO} = \frac{\text{DBO (mg O}_2/\text{mg substance)}}{\text{DCO (mg O}_2/\text{mg substance)}} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes n'aboutissant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Pour les substances à étudier azotées, choisir la DThO appropriée (NH_4 ou NO_3) en fonction de ce que l'on sait ou suppose quant à la nitrification (annexe II.2.). Si la nitrification a lieu mais de manière incomplète, calculer la correction pour l'oxygène consommé par la nitrification à partir des modifications des concentrations de nitrite et de nitrate (Annexe V).

Lorsque les mesures facultatives du carbone organique et/ou d'un produit spécifique sont effectuées, calculer le pourcentage de dégradation, comme décrit au paragraphe 1.7.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

V.3.2. Validité des résultats

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg/l d' O_2 et ne doit pas dépasser 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se situe en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par le produit à étudier est inférieure à 60 %, l'essai doit être recommencé avec une concentration en produit à étudier plus faible.

Voir également 1.5.2.

V.3.3. Rapport

Voir 1.8.

V.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-après.

ESSAI DE RESPIROMETRIE MANOMETRIQUE

1. LABORATOIRE

2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI

3. SUBSTANCE A ETUDIER

Nom :

Concentration de la solution mère :... mg/l

Concentration initiale dans le milieu, C_0 :... mg/l

Volume dans la fiole d'essai (V) :... ml

DThO / DCO :... mg O_2 /mg de produit à étudier (NH_4 , NO_3)

4. INOCULUM

Origine :...

Traitement :...

Préconditionnement éventuel :...

Concentration des matières solides en suspension dans le mélange réactionnel :... mg/l

5. CONSOMMATION D'OXYGÈNE: BIODÉGRADABILITÉ

		Temps (jours)					
		0	7	14	21	28	
Cons. O ₂ (mg) du produit à étudier	1						
	2						
	a, moy.						
Cons. O ₂ (mg) du blanc	3						
	4						
	b, moy.						
DBO corr. (mg)	(a ₁ - b _m)						
	(a ₂ - b _m)						
DBO par mg de substance d'essai	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$						
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$						
% de dégrad. $\frac{DBO}{D_{ThO}} \times 100$	D ₁ (a ₁)						
	D ₂ (a ₂)						
	Moyenne *						

V = volume de milieu dans la fiole d'essai

* Il ne faut pas calculer la moyenne de D₁ et D₂ lorsque la différence entre leurs valeurs est trop grande.

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION (voir annexe V)

Jour	0	28	Différence
i) Concentration de nitrate (mg N/l)			(N)
ii) Equivalent oxygène (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Concentration de nitrite (mg N/l)			(N)
(iv) Equivalent oxygène (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
(ii + iv) Total équivalent oxygène	—	—	

7. ANALYSE DU CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Temps (jour)	Blanc mg/l	Produit à étudier mg/l
0	(C _{blo})	(C ₀)
28 (*)	(C _{blt})	(C _t)

* ou à la fin de l'incubation

$$\% \text{ de COD éliminé} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blr}}{C_0 - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. ANALYSE SPÉCIFIQUE (facultative)

S_b = concentration dans le témoin physico-chimique (stérile), le 28ème jour.

S_a = concentration dans la fioleensemencée, le 28ème jour.

$$\% \text{ de biodégradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. DÉGRADATION ABIOTIQUE (facultative)

a = consommation d'oxygène dans les fioles stériles au bout de 28 jours, (mg).

$$\text{Consommation d'oxygène par mg de produit à étudier} = \frac{a}{C_0 V}$$

(Voir paragraphes 1 et 3)

$$\% \text{ de dégradation abiotique} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times DThO}$$

PARTIE VI. ESSAI EN FIOLES FERMEES (Méthode C.4-E)

VI.1. PRINCIPE DE LA METHODE

La solution de substance à étudier en milieu minéral, généralement d'une concentration de 2 à 5 mg/l, estensemencée avec un nombre relativement faible de micro-organismes provenant d'une population hétérogène et conservée dans des fioles fermées et remplies complètement dans l'obscurité et à température constante. La dégradation est suivie par l'analyse de l'oxygène dissous pendant une période de 28 jours. La quantité d'oxygène consommé par la substance à étudier, corrigée en fonction de la consommation dans l'essai à blanc contenant l'inoculum réalisé dans la même série, est exprimée en pourcentage de DThO ou de DCO.

VI.2. DESCRIPTION DE LA METHODE

VI.2.1. Appareillage

- a) des flacons pour analyse de la DBO, munis de bouchons de verre, d'un volume de 250 à 300 ml;
- b) un bain-marie ou un incubateur permettant de maintenir les fioles à température constante (± 1 °C au maximum) à l'abri de la lumière;
- c) de grands flacons de verre (2 à 5 l) pour la préparation des milieux et le remplissage des flacons à DBO;
- d) une électrode à oxygène couplée à un appareil de mesure, ou l'équipement et les réactifs nécessaires à la méthode de titration de Winkler.

VI.2.2. Préparation du milieu minéral

Pour la préparation des solutions mères, voir 1.6.2.

Mélanger 1 ml des solutions a) à d) et compléter le volume à un litre avec l'eau de dilution.

VI.2.3. Préparation de l'inoculum

Normalement, l'inoculum provient de l'effluent secondaire d'une station d'épuration ou d'une unité pilote qui reçoit principalement des eaux ménagères. L'eau de surface peut constituer une autre source d'inoculum. Utiliser normalement une goutte (0,05 ml) à 5 ml de filtrat par litre de milieu; il peut être nécessaire de procéder à des essais afin de déterminer le volume optimal pour un effluent donné (voir I.6.4.2. et I.6.5.)

VI.2.4. Préparation des fioles

Aérer fortement le milieu minéral pendant au moins 20 mn. Chaque série d'essais doit être effectuée avec du milieu minéral provenant d'un lot unique. Le milieu est généralement prêt à l'emploi après être resté pendant 20 heures à la température de l'essai. Déterminer la concentration d'oxygène dissous à des fins de contrôle; la valeur obtenue doit être proche de 9 mg/l à 20 °C. Effectuer toutes les opérations de transfert et de remplissage avec le milieu saturé d'air en évitant la formation de bulles, par exemple à l'aide de siphons.

Préparer des lots parallèles de flacons à DBO pour les déterminations avec la substance d'essai et la substance de référence dans des séries expérimentales simultanées. Réunir un nombre suffisant de flacons à DBO, comprenant des essais à blanc avec l'inoculum, pour pouvoir effectuer, au moins en double, les mesures de la consommation d'oxygène aux intervalles de temps souhaités, par exemple après 0, 7, 14, 21 et 28 jours. Un plus grand nombre de flacons peut être nécessaire pour être sûr de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Transférer le milieu minéral parfaitement aéré dans les grands flacons de manière à remplir à peu près le tiers de leur volume. Ajouter ensuite dans de grands flacons distincts une quantité de solution mère du produit à étudier ou du produit de référence telle que la concentration finale ne dépasse pas, normalement, 10 mg/l. N'ajouter aucune substance dans le grand flacon destiné à l'essai à blanc.

Pour s'assurer que l'activité de l'inoculum n'est pas limitée, la concentration d'oxygène dissous ne doit pas descendre en-dessous de 0,5 mg/l dans les flacons à DBO. La concentration de produit à étudier se trouve ainsi limitée à environ 2 mg/l. Toutefois, on peut utiliser une concentration comprise entre 5 et 10 mg/l pour les composés peu dégradables et les composés dont la DThO est faible. Dans certains cas, il est préférable d'effectuer des séries d'essais en parallèle avec deux concentrations différentes, par exemple 2 et 5 mg/l. La DThO est normalement calculée à partir de la formation de sels d'ammonium, mais si l'on suppose ou si l'on est sûr qu'une nitrification doit avoir lieu, il convient alors de calculer la $DThO_{NO_3}$ en se basant sur la formation de nitrate (voir annexe II.2). Toutefois, si une nitrification se produit mais sans être complète, il faut effectuer une correction tenant compte des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate déterminées par l'analyse (voir annexe V).

Si la toxicité du produit à étudier doit être recherchée (dans le cas, par exemple, où une faible biodégradabilité aurait été observée au préalable), une autre série de flacons est nécessaire.

Préparer un autre grand flacon contenant du milieu minéral aéré (jusqu'au tiers de son volume environ) auquel on ajoute la substance à étudier et le produit de référence à des concentrations finales normalement égales à celles des autres grands flacons.

Ensemencer les solutions contenues dans les grands flacons avec un effluent secondaire (dont le volume est compris entre une goutte, soit environ 0,05 ml, et 5 ml) ou avec un inoculum d'une autre origine, comme de l'eau de rivière (voir 1.6.4.2.). Enfin, compléter le volume des solutions avec du milieu minéral aéré à l'aide d'un tuyau touchant le fond du flacon pour permettre un mélange adéquat.

VI.2.5. Nombre de fioles d'une série type

Une série type comporte les flacons suivants :

- au moins 10 flacons contenant la substance à étudier et l'inoculum (suspension d'essai);
- au moins 10 flacons ne contenant que l'inoculum (essai à blanc avec l'inoculum);
- au moins 10 flacons contenant le produit de référence et l'inoculum (contrôle de la procédure),

et, si nécessaire, 6 flacons contenant la substance à étudier, le produit de référence et l'inoculum (contrôle de toxicité). Néanmoins, pour être certain de pouvoir identifier l'intervalle de temps de 10 jours, il faudrait environ deux fois plus de flacons.

VI.2.6. Déroulement de l'essai

Toutes les solutions préparées sont immédiatement transférées dans le lot correspondant de flacons à DBO à l'aide d'un tuyau plongeant aux trois quarts (pas jusqu'au fond) du grand flacon approprié de telle sorte que tous les flacons à DBO soient complètement remplis. Tapoter doucement pour éliminer toutes les bulles d'air. L'oxygène dissous est analysé immédiatement dans les flacons destinés à la mesure au temps 0, par la méthode de Winkler ou avec une électrode. Le contenu des flacons peut être conservé en vue d'une analyse ultérieure par la méthode de Winkler si on lui ajoute du sulfate de manganèse (II) et de l'hydroxyde de sodium (le premier réactif de la méthode de Winkler). Les flacons dont le contenu en oxygène est fixé sous forme d'hydroxyde de manganèse (III) brun, sont conservés soigneusement fermés à l'obscurité, et à une température comprise entre 10 et 20 °C. Ne pas attendre plus de 24 heures avant de procéder aux étapes suivantes de la méthode de Winkler. Fermer les autres flacons préparés parallèlement en s'assurant qu'ils ne contiennent pas de bulles d'air et les incubés à 20 °C à l'obscurité. Chaque série doit être accompagnée d'une série complète d'essais à blanc ensemencés pour la détermination du témoin inoculum. Prélever régulièrement (au moins chaque semaine) deux flacons au moins dans chaque série, afin d'analyser l'oxygène dissous pendant la durée de l'incubation qui est de 28 jours.

Les prélèvements hebdomadaires d'échantillons permettent de déterminer le pourcentage de disparition dans un intervalle de 14 jours, alors que les prélèvements effectués tous les 3 ou 4 jours, qui nécessitent environ deux fois plus de flacons, permettent d'identifier l'intervalle de temps de 10 jours.

Si la substance à étudier contient de l'azote, il convient d'effectuer une correction pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification. Pour cela, déterminer la concentration d'oxygène dissous par la méthode de l'électrode à O_2 et, ensuite, analyser la teneur en nitrite et en nitrate sur un échantillon prélevé dans le flacon DBO. Calculer la quantité d'oxygène utilisée sur la base de l'augmentation de la concentration de nitrite et de nitrate (voir annexe V).

VI.3. RESULTATS ET RAPPORT

VI.3.1. Traitement des résultats

En premier lieu, calculer la DBO après chaque période de temps en soustrayant la perte en oxygène (mg O_2 /l) dans l'essai à blanc contenant l'inoculum de celle que l'on observe avec la substance à étudier. Diviser cette perte en oxygène ainsi corrigée par la concentration (mg/l) de la substance à étudier. Le résultat obtenu correspond à la DBO spécifique exprimée en mg d'oxygène par mg de substance d'essai. Calculer le pourcentage de biodégradabilité en divisant la DBO spécifique par la DThO spécifique (calculée selon les indications données à l'annexe II.2) ou par la DCO (déterminée par analyse, voir annexe II.3).

Ainsi :

$$DBO = \frac{\text{mg } O_2 \text{ consommé par la substance à étudier} - \text{mg } O_2 \text{ consommé par le blanc}}{\text{mg de substance à étudier dans la fiole}}$$

$$= \text{mg d}'O_2 \text{ par mg de produit à étudier}$$

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{DBO \text{ (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}}{DThO \text{ (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}} \times 100$$

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{DBO \text{ (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}}{DCO \text{ (mg } O_2/\text{mg de substance à étudier)}} \times 100$$

Il faut noter que ces deux méthodes ne conduisant pas nécessairement au même résultat, il est préférable d'utiliser la première.

Dans le cas où la substance d'essai contient de l'azote, il convient d'utiliser la DThO appropriée (NH₄ ou NO₃) en fonction des connaissances ou des prévisions concernant l'éventualité de la nitrification (Annexe II.2.). Si une nitrification a lieu sans toutefois être complète, corriger pour tenir compte de la consommation d'oxygène due à la nitrification à partir des modifications de la concentration de nitrite et de nitrate (Annexe V).

VI.3.2. Validité des résultats

La perte d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum ne doit pas dépasser 1,5 mg/l d'oxygène dissous après 28 jours. Des valeurs supérieures nécessitent une vérification des méthodes expérimentales. La concentration résiduelle d'oxygène dans les flacons d'essai ne doit à aucun moment descendre au-dessous de 0,5 mg/l. Une teneur en oxygène aussi basse n'est acceptable que si la méthode utilisée pour mesurer l'oxygène dissous est capable de mesurer de telles concentrations avec précision.

Voir également I.5.2.

VI.3.3. Rapport

Voir I.8.

VI.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI EN FIOLES FERMEES

1. LABORATOIRE
2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI
3. SUBSTANCE A ETUDIER

Nom :

Concentration de la solution mère :... mg/l

Concentration initiale dans la fiole :... mg/l

DThO / DCO :... mg O₂/mg de produit à étudier

4. INOCULUM

Origine :...

Traitement :...

Préconditionnement éventuel :...

Concentration dans le mélange réactionnel :... mg/l

5. DETERMINATION DE L'OD

Méthode de Winkler ou de l'électrode

Analyses des fioles

	Temps d'incubation (d)		OD (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Blanc (sans produit)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Moyenne	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Produit à étudier	1	a ₁				
	2	a ₂				
Moyenne	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et le témoin de toxicité.

6. CORRECTION TENANT COMPTE DE LA NITRIFICATION (Annexe V)

Temps d'incubation (d)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Concentration de nitrate (mg N/l)				
(ii) Modif. de la conc. de nitrate (mg N/l)	—			
(iii) Equivalent oxygène (mg/l)	—			
(iv) Concentration de nitrite (mg N/l)				
(v) Modif. de la conc. de nitrite (mg N/l)	—			
(vi) Equivalent oxygène (mg/l)	—			
(iii + vi) Total équivalent oxygène (mg/l)	—			

7. PERTE D'OD: % DE DÉGRADATION

	Perte après n jours (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
FIOLE 1: $(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})$				
FIOLE 2: $(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})$				
FIOLE 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times D_{thO}}$				
FIOLE 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{conc. produit à étudier} \times D_{thO}}$				
$\% D \text{ moyen} = \frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Ne pas utiliser la moyenne si les résultats des essais en double varient considérablement.

m_{t_0} = valeur dans la fiole d'essai au temps 0

m_{t_x} = valeur dans la fiole d'essai au temps x

m_{b_0} = valeur moyenne du blanc au temps 0

m_{b_x} = valeur moyenne du blanc au temps x

Appliquer également la correction tenant compte de la nitrification mentionnée aux points (iii) et (vi) du paragraphe 6.

8. PERTE d'OD DANS L'ESSAI A BLANC

Consommation d'oxygène dans l'essai à blanc: $(m_{b_0} - m_{b_{28}})$ mg/l. Cette consommation est importante pour la validité de l'essai. Elle doit être inférieure à 1,5 mg/l.

PARTIE VII. ESSAI M.I.T.I. (Méthode C.4-F)

VII.1. PRINCIPE DE LA METHODE

La consommation d'oxygène d'une solution ou d'une suspension agitée de substance à étudier dans un milieu minéral,ensemencée avec des micro-organismes cultivés à cet effet sans adaptation préalable, est établie à l'aide d'un respiromètre automatique en circuit fermé, à l'obscurité, pendant une période de 28 jours à 25 ± 1 °C. Le dioxyde de carbone dégagé est absorbé par de la chaux sodée. La biodégradabilité est exprimée par le pourcentage de la consommation d'oxygène (corrigé en fonction de la consommation dans l'essai à blanc) par rapport à la consommation théorique (D_{thO}). Le pourcentage de biodégradabilité primaire est également calculé d'après les analyses chimiques spécifiques supplémentaires effectuées au début et à la fin de l'incubation et, éventuellement, à l'aide de l'analyse du COD.

VII.2. DESCRIPTION DE LA METHODE

VII.2.1. Appareillage

a) appareil de mesure automatique de la DBO par électrolyse ou respiromètre normalement équipé de 6 fioles d'une contenance de 300 ml chacune et de récipients contenant l'absorbant de CO₂;

b) pièce thermostatée et/ou bain-marie à 25 °C (± 1 °C au maximum);

c) dispositif de filtration sur membrane (facultatif);

d) analyseur de carbone (facultatif).

VII.2.2. Préparation du milieu minéral

Préparer les solutions mères suivantes, à l'aide de réactifs de qualité analytique et d'eau (1.6.1.) :

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Monohydrogénophosphate de potassium, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Monohydrogénophosphate de sodium dodécahydraté, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Chlorure d'ammonium, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| | Le pH de la solution doit être égal à 7,2 | |
| b) | Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| c) | Chlorure de calcium, anhydre CaCl_2 | 27,50 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |
| d) | Chlorure de fer (III) hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Dissoudre dans de l'eau et compléter le volume à 1 litre | |

Prélever 3 ml de chacune des solutions a), b) c) et d) et compléter le volume à 1 litre.

VII.2.3. Préparation de l'inoculum

Recueillir des échantillons frais dans 10 emplacements au moins, principalement dans des zones où divers produits chimiques sont utilisés et rejetés dans l'environnement. Recueillir des échantillons d'un litre de boue, de sols superficiels, d'eau, etc, dans des sites tels que les stations d'épuration des eaux d'égout, les stations d'épuration industrielle, les rivières, les lacs et les mers et bien les mélanger. Après avoir enlevé les matières flottantes, laisser reposer le mélange, puis ajuster le pH du surnageant à 7 ± 1 au moyen d'hydroxyde de sodium ou d'acide phosphorique.

Utiliser un volume de surnageant filtré suffisant pour remplir un récipient de traitement des boues activées et aérer le liquide pendant environ 23 heures 30. Trente minutes après avoir interrompu l'aération, retirer environ un tiers du volume total du liquide surnageant et ajouter à la partie décantée un volume égal d'une solution (pH 7) contenant 0,1 % de chacun des produits suivants : glucose, peptone, monophosphate de potassium, puis aérer à nouveau le mélange. Répéter cette opération chaque jour. La réserve de boue doit être préparée selon les bonnes pratiques : l'effluent doit être clair, la température doit être maintenue à 25 ± 2 °C, son pH égal à 7 ± 1 , la boue doit bien décanter, l'aération doit être suffisante pour que le mélange soit en permanence en aérobiose, des protozoaires doivent être présents et l'activité de la boue doit être testée à l'aide d'une substance de référence au moins tous les trois mois. Ne pas utiliser la boue comme inoculum avant au moins un mois après sa préparation ni après plus de quatre mois. Il convient donc d'effectuer périodiquement des prélèvements d'échantillons, tous les trois mois, en 10 emplacements différents au moins.

Afin de conserver la même activité aux boues fraîches et anciennes, le surnageant filtré d'une boue activée utilisée pour l'essai doit être mélangé en volume égal au surnageant filtré d'une boue fraîchement recueillie provenant de dix sources différentes. Le mélange ainsi obtenu est mis en culture comme décrit ci-avant. Prélever la boue pour l'utiliser comme inoculum 18 à 24 heures après cette opération.

VII.2.4. Préparation des fioles

Préparer les six fioles suivantes :

N° 1 : eau de dilution contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N°s 2, 3 et 4 : milieu minéral contenant 100 mg/l de substance à étudier,

N° 5 : milieu minéral contenant 100 mg/l de produit de référence (par exemple de l'aniline),

N° 6 : milieu minéral seul.

Si la substance à étudier est peu soluble, il convient d'en ajouter directement un poids ou un volume défini, ou de procéder selon les instructions figurant à l'annexe III, en n'utilisant toutefois ni solvant ni émulsifiant. Placer l'absorbant de CO_2 pour chaque fiole, dans la coupelle spécialement prévue à cet effet. Ajuster à 7,0 le pH de la solution contenue dans les fioles n°s 2, 3 et 4.

VII.2.5. Déroulement de l'essai

Ensemencer les fioles n° 2, 3 et 4 (suspensions d'essai), n° 5 (témoin d'activité) et n° 6 (blanc contenant l'inoculum) avec un petit volume d'inoculum de manière à ce que la concentration des matières solides en suspension soit égale à 30 mg/l. Ne pas ajouter d'inoculum dans la fiole n° 1 qui sert de témoin abiotique. Assembler le matériel, vérifier l'étanchéité à l'air, brancher les agitateurs et commencer à mesurer la consommation d'oxygène dans l'obscurité. Vérifier chaque jour la température et le fonctionnement des agitateurs et de l'enregistreur de l'appareil de mesure coulométrique de la consommation d'oxygène et noter toute modification de couleur du milieu contenu dans les fioles. Lire la consommation d'oxygène dans les six fioles directement avec une méthode appropriée, par exemple sur l'enregistreur à six points, qui fournit une courbe de la DBO. A la fin de l'incubation, dont la durée normale est de 28 jours, mesurer le pH du contenu des fioles et déterminer la concentration résiduelle de la substance à étudier et de toute substance intermédiaire et dans le cas d'une substance hydrosoluble, la concentration de COD (Annexe II.4). Des précautions particulières doivent être prises pour étudier les produits volatiles. Si un processus de nitrification est prévisible, déterminer, si possible, la concentration en nitrates et nitrites.

VII.3. PRESENTATION DES DONNEES

VII.3.1. Traitement des résultats

La quantité d'oxygène consommée (mg) par la substance d'essai après un temps donné, corrigée de façon à tenir compte de la quantité d'O₂ consommée dans l'essai à blanc contenant l'inoculum après la même période de temps, est divisée par le poids de substance à étudier utilisé pour l'essai. Le résultat ainsi obtenu correspond à la DBO exprimée en mg d'oxygène/mg de substance d'essai, c'est-à-dire :

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg O}_2 \text{ consom. par la substance d'essai} - \text{mg O}_2 \text{ consom. par le blanc}}{\text{mg de substance d'essai dans la fiole}}$$

$$= \text{mg d'O}_2/\text{mg de substance d'essai}.$$

Le pourcentage de biodégradation est alors obtenu à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ de biodégradation} = \% \text{ DThO} = \frac{\text{DBO (mg O}_2/\text{mg produit)}}{\text{DThO (mg O}_2/\text{mg produit)}} \times 100$$

Pour les mélanges, calculer la DThO à partir de l'analyse élémentaire, comme pour un composé simple. Choisir la DThO appropriée (DThO_{NH₄} ou DThO_{NO₃}) selon que la nitrification est absente ou complète (Annexe II.2).

Cependant, si la nitrification se produit mais sans toutefois être complète, il convient d'effectuer une correction correspondant à la quantité d'oxygène consommée par la nitrification à partir des modifications de la concentration en nitrites et en nitrates (Annexe V).

Calculer le pourcentage de biodégradation primaire à partir de la perte de produit chimique spécifique (d'origine) (voir I.7,2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de produit d'essai dans la fiole n° 1, il convient de le consigner et de calculer le pourcentage de biodégradation en utilisant la concentration de substance d'essai (S_b) dans la fiole au bout de 28 jours.

Si la concentration de COD est déterminée (facultatif), calculer le pourcentage de biodégradation ultime à l'aide de la formule suivante :

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{br}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

décrite au paragraphe 1.7.1. Si la mesure de la disparition physico-chimique révèle une perte de COD dans la fiole n° 1, il convient de calculer le pourcentage de dégradation en utilisant la concentration de COD dans cette fiole.

Consigner tous les résultats sur les fiches de données fournies.

VII.3.2. Validité des résultats

La consommation d'oxygène dans l'essai à blanc contenant l'inoculum est normalement comprise entre 20 et 30 mg O₂/l et ne doit pas excéder 60 mg/l en 28 jours. Des valeurs supérieures à 60 mg/l nécessitent un examen critique des données et des méthodes expérimentales. Si la valeur du pH se trouve en dehors de l'intervalle compris entre 6 et 8,5 et si la consommation d'oxygène par la substance d'essai est inférieure à 60 %, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible de substance à étudier.

Voir également I.5.2.

Si le pourcentage de dégradation de l'aniline calculé à partir de la consommation d'oxygène ne dépasse pas 40 % après 7 jours et 65 % après 14 jours, l'essai est considéré comme non valable.

VII.3.3. Rapport

Voir I.8.

VII.4. FICHE DE DONNEES

Un exemple de fiche de données est présenté ci-dessous.

ESSAI MITI (I)

1. LABORATOIRE

2. DATE DU DEBUT DE L'ESSAI

3. SUBSTANCE A ETUDIER

Nom :

Concentration de la solution mère :... mg/l de produit

Conc. initiale dans le milieu, C_o :... mg/l de produit

Volume du mélange réactionnel, V :... ml

DThO :... mg O₂/l

4. INOCULUM

Emplacements d'échantillonnage des boues :

1)...	6)...
2)...	7)...
3)...	8)...
4)...	9)...
5)...	10)...

Concentration des matières en suspension dans la boue activée après acclimatation à l'aide d'une eau d'égout synthétique = mg/l

Volume de boue activée par litre de milieu final = ml

Concentration de boue dans le milieu final = mg/l

5. CONSOMMATION D'OXYGENE : BIODEGRADABILITE

Type de respiromètre utilisé :

		Temps (jours)				
		0	7	14	21	28
• Cons. d'O ₂ (mg) du produit	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
Cons. d'O ₂ (mg) du blanc	b					
Cons. d'O ₂ corrigée (mg)	(a ₁ - b) (a ₂ - b) (a ₃ - b)					
DBO par mg de produit	$\frac{(a-b)}{C_0V}$	Fiole 1				
		Fiole 2				
		Fiole 3				
% dégradation $\frac{DBO}{DThO} \times 100$		1				
		2				
		3				
		moy. *				

(*) Ne pas calculer la moyenne lorsque la différence entre les réplicats est trop grande.

Note: Des tableaux de ce type peuvent être utilisés pour le produit de référence et les témoins de toxicité.

6. ANALYSE DE CARBONE (facultative)

Analyseur de carbone: ...

Fiole	COD		% COD éliminé	Moy.
	Mesuré	Corrigé		
Eau + subst. d'essai	a		—	—
Boue + subst. d'essai	b ₁	b ₁ - c		
Boue + subst. d'essai	b ₂	b ₂ - c		
Boue + subst. d'essai	b ₃	b ₃ - c		
Essai à blanc	c	-	—	—

$$\% \text{ COD éliminé: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. DONNÉES DE L'ANALYSE SPÉCIFIQUE CHIMIQUE

	Quantité résiduelle de produit à la fin de l'essai	% de dégradation
essai à blanc avec de l'eau	S _b	
milieu inoculé	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ de dégradation} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calculer le % de dégradation pour les fioles a₁, a₂ et a₃ respectivement.

8. OBSERVATIONS

La courbe de la DBO en fonction du temps doit, le cas échéant, être jointe.

ANNEXE I

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

OD : oxygène dissous (mg/l), c'est-à-dire la concentration d'oxygène dissous dans un échantillon aqueux.

DBO : demande biochimique en oxygène (g), soit la quantité d'oxygène consommée par des micro-organismes au moment où ils métabolisent un produit soumis à l'essai; la DBO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de produit à étudier (voir la méthode C₃).

DCO : demande chimique d'oxygène (g), c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommée au cours de l'oxydation d'un produit à étudier en présence de bichromate acide chaud; la DCO fournit une mesure de la quantité de matière oxydable présente; la DCO est également exprimée en g d'oxygène consommé par g de substance à étudier (voir méthode C.6).

COD : carbone organique dissous. Il s'agit du carbone organique présent dans une solution ou qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre ou encore qui reste dans le surnageant après une centrifugation de 15 min à 40 000 m.s⁻² (± 4 000 g).

DThO : demande théorique en oxygène (mg), c'est-à-dire la quantité totale d'oxygène nécessaire pour parvenir à l'oxydation complète d'un produit chimique. Elle est calculée à partir de la formule moléculaire (voir annexe II.2). La DThO est également exprimée en mg d'oxygène nécessaire par mg de produit à étudier.

CO₂Th : dioxyde de carbone théorique (mg). Il s'agit de la quantité calculée de dioxyde de carbone pouvant être produite à partir du contenu en carbone mesuré ou connu dans le produit à étudier, lors de sa minéralisation totale. Le CO₂Th est également exprimé en mg de dioxyde de carbone qui se dégage par mg de produit à étudier.

COT : carbone organique total. Le COT d'un échantillon est égal à la somme du carbone organique en solution et en suspension.

CI : carbone inorganique.

CT : carbone total. Le CT est égal à la somme du carbone organique et du carbone inorganique présents dans l'échantillon.

Biodégradation primaire :

Altération de la structure chimique d'une substance obtenue par une action biologique et entraînant la perte de propriétés spécifiques de cette substance.

Biodégradation ultime (en aérobiose) :

Taux de dégradation atteint lorsque la totalité de la substance à étudier a été utilisée par des micro-organismes pour produire du dioxyde de carbone, de l'eau, des sels minéraux et de nouveaux constituants cellulaires microbiens (biomasse).

Facilement biodégradable :

Il s'agit d'un classement arbitraire des produits chimiques qui ont répondu positivement à des essais portant sur la biodégradabilité ultime; du fait de la rigueur de ces essais, on suppose que ces composés se dégradent rapidement et complètement en milieu aquatique dans des conditions d'aérobiose.

Intrinsèquement biodégradable :

Il s'agit d'une classification des produits chimiques dont la biodégradation (primaire ou ultime) a été prouvée sans ambiguïté au cours d'un essai de biodégradabilité reconnu internationalement.

Traitabilité :

Aptitude des composés à disparaître au cours du traitement biologique des eaux résiduaires sans effet indésirable sur le déroulement normal du traitement. D'une manière générale, les composés facilement biodégradables sont traitables, ce qui n'est pas le cas de tous les composés intrinsèquement biodégradables. Des processus abiotiques peuvent également se produire.

Phase de latence

correspond à la période qui, au cours d'un essai de disparition, sépare le moment de l'ensemencement de celui où le pourcentage de dégradation a augmenté d'au moins 10 %. La durée de la phase de latence est souvent extrêmement variable et peu reproductible.

Phase de dégradation

correspond à la période qui commence à la fin de la phase de latence et se termine au moment où 90 % du taux maximal de dégradation a été atteint.

Intervalle de 10 jours

Il s'agit des 10 jours immédiatement consécutifs au moment où le taux de dégradation atteint 10 %.

ANNEXE II

CALCUL ET DETERMINATION DE PARAMETRES APPROPRIES

Certains paramètres seront requis en fonction de la méthode choisie. Le chapitre suivant décrit le calcul de ces valeurs. L'utilisation de ces paramètres est décrite dans les chapitres consacrés à chaque méthode.

1. Teneur en carbone

La teneur en carbone est calculée à partir de la composition élémentaire connue de la substance à étudier, ou déterminée par l'analyse élémentaire de cette substance.

2. Demande théorique en oxygène (DThO)

La demande théorique en oxygène (DThO) peut être calculée si la composition élémentaire est connue ou déterminée par analyse élémentaire. Par exemple la DThO du composé suivant :



sera, en l'absence de nitrification, égale à:

$$DThO_{NH_4} = \frac{16 [2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{PM} \text{ mg/mg}$$

et si une nitrification a lieu, elle sera égale à:

$$DThO_{NO_3} = \frac{16 [2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{PM} \text{ mg/mg}$$

3. Demande chimique en oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) est déterminée à l'aide de la méthode C.6.

4. Carbone organique dissous (COD)

Le carbone organique dissous (COD) est, par définition, le carbone organique présent dans la solution aqueuse d'un produit chimique ou d'un mélange, qui traverse un filtre d'une porosité de 0,45 micromètre.

Prélever des échantillons dans les récipients d'essai et les filtrer immédiatement à l'aide d'un dispositif de filtration en utilisant une membrane filtrante appropriée. Les 20 premiers ml de filtrat (la quantité peut être réduite si on utilise des filtres de petite taille) sont éliminés. Un volume de filtrat compris entre 10 et 20 ml, ou moins s'il doit être injecté (le volume dépend de la quantité requise pour l'analyseur de carbone), est retenu afin d'en analyser la teneur en carbone. La concentration en COD est déterminée à l'aide d'un analyseur de carbone organique capable de mesurer avec précision une concentration de carbone égale ou inférieure à 10 % de la concentration initiale de COD utilisée pour l'essai.

Les échantillons filtrés qui ne sont pas analysés le jour même peuvent être conservés pendant 48 heures dans un réfrigérateur entre 2 et 4 °C ou en-dessous de - 18 °C pour des périodes plus longues.

Remarque :

Les membranes filtrantes étant souvent imprégnées d'agents tensio-actifs pour l'hydrophilisation, sont susceptibles de contenir plusieurs milligrammes de carbone organique soluble qui interfèrent avec les déterminations de la biodégradabilité. Pour débarrasser les filtres des agents tensio-actifs ainsi que d'autres composés organiques solubles, il convient de les faire bouillir trois fois pendant une heure dans de l'eau déionisée. Ils peuvent ensuite être conservés dans de l'eau pendant une semaine. Si l'on utilise des cartouches filtrantes à usage unique, chaque lot doit être vérifié afin de s'assurer qu'il ne libère pas de carbone organique soluble.

La substance à étudier peut être retenue par adsorption sur certains types de membranes filtrantes. C'est pourquoi il est conseillé de s'assurer que le produit à étudier n'est pas retenu par le filtre.

Une centrifugation à 40 000 m. sec⁻² (4 000 g) pendant 15 min peut remplacer la filtration pour distinguer le COT du COD. Cette méthode n'est pas fiable si la concentration initiale en COD est inférieure à 10 mg/l, soit parce que toutes les bactéries ne sont pas éliminées, soit parce que du carbone faisant partie intégrante du plasma bactérien est redissous.

BIBLIOGRAPHIE

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Publ. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R. Von Wasser, 1976, Vol 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41—Deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs — und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

*Annexe III***EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE DES SUBSTANCES FAIBLEMENT SOLUBLES**

Lors des essais de biodégradabilité concernant des substances faiblement solubles, il faut prêter une attention particulière aux éléments énoncés ci-après.

Alors que les liquides homogènes posent rarement des problèmes d'échantillonnage, il est recommandé d'homogénéiser les matières solides par des moyens appropriés afin d'éviter les erreurs dues au manque d'homogénéité. Il convient de prendre des précautions particulières pour prélever, dans des mélanges de produits chimiques ou dans des substances riches en impuretés, des échantillons de quelques milligrammes qui soient représentatifs.

Différents types d'agitation peuvent être utilisés au cours de l'essai, mais il faut veiller à ce que l'agitation soit juste suffisante pour maintenir la dispersion du produit tout en évitant une surchauffe, la formation excessive de mousse ou des forces de cisaillement excessives.

Il est possible d'utiliser un émulsifiant qui produise une dispersion stable du produit. Il ne devra ni être toxique pour les bactéries, ni être biodégradé, ni former de la mousse dans les conditions d'essai.

Les mêmes critères s'appliquent aux solvants et aux émulsifiants.

Il n'est pas conseillé d'utiliser des supports solides pour les produits solides; leur utilisation peut, par contre, être appropriée dans le cas des substances huileuses.

Lorsqu'une substance auxiliaire, telle qu'un émulsifiant, un solvant ou un support, est utilisée, il convient d'effectuer un essai à blanc avec cette substance.

Les trois essais de respirométrie, CO₂, DBO ou MITI, conviennent pour étudier la biodégradabilité des composés faiblement solubles.

BIBLIOGRAPHIE

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Genke, P. The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

Annexe IV

EVALUATION DE LA BIODEGRADABILITE DES PRODUITS CHIMIQUES SUSPECTES DE TOXICITE
VIS-A-VIS DE L'INOCULUM

Lorsqu'un produit est soumis à des essais de biodégradabilité facile et semble ne pas être biodégradable, il est recommandé de suivre la procédure suivante si l'on souhaite effectuer une distinction entre inhibition et inertie (Reynolds et al., 1987).

Il convient de procéder aux essais de toxicité et de biodégradation avec des inoculums semblables ou identiques.

Pour évaluer la toxicité des produits soumis aux essais de biodégradabilité facile, il semble approprié d'appliquer soit l'une des méthodes suivantes soit une combinaison de ces méthodes : inhibition du taux de respiration de la boue (essai d'inhibition de la respiration des boues activées—directive 88/302/CEE), DBO et/ou inhibition de la croissance.

S'il convient d'éviter l'inhibition due à la toxicité, il est suggéré d'utiliser pour les essais de biodégradabilité facile des concentrations de la substance d'essai inférieures au 1/10 de la valeur de la CE_{50} obtenue lors des essais de toxicité (ou inférieures à la valeur de la CE_{20}). Il est peu vraisemblable que les composés dont la CE_{50} a une valeur supérieure à 300 mg/l produisent un effet toxique lors des tests de biodégradabilité facile. Il est vraisemblable que des valeurs de CE_{50} inférieures à 20 mg/l poseront de sérieux problèmes lors des essais ultérieurs. Il convient dans ce cas d'employer de faibles concentrations d'essai nécessitant l'utilisation de l'essai en fioles fermées, qui est rigoureux et sensible, ou de produit marqué au ^{14}C . Une autre manière de procéder consiste à utiliser un inoculum acclimaté permettant d'utiliser des concentrations plus élevées de substance d'essai. Toutefois, dans ce cas, on perd le critère spécifique de l'essai de biodégradation facile.

BIBLIOGRAPHIE

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

Annexe V

CORRECTION TENANT COMPTE DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DUE
A L'INTERFERENCE DE LA NITRIFICATION

Les erreurs commises en ne tenant pas compte de la nitrification lors de la détermination de la biodégradabilité par mesure de la consommation d'oxygène sont mineures (inférieures à 5 %) lorsque les substances à étudier ne contiennent pas d'azote, même si l'oxydation de l'azote ammoniacal dans le milieu se produit occasionnellement dans les récipients d'essai ainsi que dans les essais à blanc. Par contre, des erreurs importantes peuvent se produire avec les substances qui contiennent de l'azote.

Si la nitrification se produit, mais n'est pas complète, la consommation d'oxygène observée dans le mélange réactionnel peut être corrigée d'une valeur correspondant à la quantité d'oxygène utilisée pour oxyder l'ammonium en nitrite et en nitrate, si les modifications de la concentration de nitrite et de nitrate au cours de l'incubation sont déterminées par les équations suivantes :



Au total:



D'après l'équation (1), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote contenus dans du chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour former des nitrites est égale à 96 g, ce qui correspond à un facteur 3,43 (96/28). De même, d'après l'équation (3), la quantité d'oxygène consommée par l'oxydation de 28 g d'azote pour former des nitrates est de 128 g, ce qui correspond à un facteur 4,57 (128/28).

Les réactions étant *séquentielles* et effectuées par différentes espèces bactériennes distinctes, la concentration en nitrite peut augmenter ou diminuer; dans ce dernier cas, la concentration de nitrate est équivalente. La quantité d'oxygène consommée par la formation de nitrate est donc égale à 4,57 multiplié par l'augmentation de la concentration de nitrate, alors que la quantité d'oxygène associée à la formation de nitrite est égale à 3,43 multiplié par l'augmentation de la concentration en nitrite ou dans le cas d'une réduction de sa teneur, la perte en oxygène est égale à - 3,43 multiplié par la diminution de concentration.

Ainsi :

$$\text{O}_2 \text{ consommé par la formation de nitrate} = 4,57 \times \text{augmentation de la concentration de N-nitrate} \quad (4),$$

$$\text{O}_2 \text{ consommé par la formation de nitrite} = 3,43 \times \text{augmentation de la concentration de N-nitrite} \quad (5)$$

et donc

$$\text{O}_2 \text{ perdu lors de la disparition de nitrite} = -3,43 \times \text{réduction de la concentration de N-nitrite} \quad (6)$$

De telle sorte que:

$$\text{la consommation d'O}_2 \text{ due à la nitrification} = \pm 3,43 \times \text{modif. de la conc. de N-nitrite} + 4,57 \times \text{augm. de la conc. de N-nitrate} \quad (7)$$

et donc:

$$\text{la consommation d'O}_2 \text{ due à l'oxydation du C} - \text{consommation totale observée} - \text{consommation due à la nitrification} \quad (8).$$

Une autre possibilité consiste à estimer que, si seul l'azote oxydé total est déterminé, la consommation d'oxygène due à la nitrification sera, en première approximation, égale à 4,57 x l'augmentation de la teneur en azote oxydé.

La valeur corrigée de la consommation d'oxygène due à l'oxydation du C est ensuite comparée à la $D\text{ThO}_{\text{NH}_4}$ calculée selon les instructions figurant à l'annexe II.

C.5. DEGRADATION — DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGENE**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

La méthode a pour objet la mesure de la demande biochimique en oxygène (DBO) de substances organiques, liquides ou solides.

Les données fournies par cet essai concernent les composés hydrosolubles; toutefois, les composés volatils et les composés à faible hydrosolubilité peuvent également être étudiés, 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 de l'essai. 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 être utilisées, 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 faibles et pour le choix de concentrations d'essai appropriées.

1.2. DEFINITION ET UNITES

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 l'essai.

1.3. SUBSTANCE DE REFERENCE

Il est souhaitable de vérifier l'activité de l'inoculum à l'aide d'une substance de référence appropriée.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE 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 blanc doit être déterminé dans un essai parallèle ne contenant pas de substance d'essai.

1.5. CRITERES DE QUALITE

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 METHODE 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 toute méthode appropriée, normalisée, nationale ou internationale.

2. EVALUATION DES DONNEES

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. RESULTATS

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 intrinsèque de la substance susceptibles d'affecter les résultats.

L'utilisation de tout additif inhibiteur de la nitrification biologique doit être consignée.

4. REFERENCES

Exemples de méthodes normalisées :

NF T 90-103 : Détermination de la demande biochimique en oxygène.

NBN 407 : Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4 : Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815 : Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. DEGRADATION — DEMANDE CHIMIQUE EN OXYGENE**1. METHODE****1.1. INTRODUCTION**

La méthode a pour objet la mesure de la demande chimique en oxygène (DCO) de substances organiques, liquides ou solides, 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. DEFINITIONS ET UNITES

La demande chimique en oxygène est la mesure de l'oxydabilité d'une substance, définie comme la quantité d'oxygène d'un réactif oxydant, consommée 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 REFERENCE

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 permettre la comparaison des résultats en cas d'application de méthodes différentes.

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE 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 reflux pendant deux heures. Le bichromate résiduel est dosé par titration à l'aide de sulfate ferreux ammoniacal titré.

Au cas où les substances contiennent du chlore, ajouter du sulfate mercurique (*) pour réduire l'interférence des chlorures.

1.5. CRITERE DE QUALITE

En raison des conditions arbitraires de détermination de la DCO, cette dernière est un « indicateur d'oxydabilité » à utiliser en tant que tel comme méthode pratique de mesure de matière organique.

Les chlorures peuvent interférer au cours de cet essai; des substances inorganiques réductrices ou oxydantes peuvent également interférer avec la détermination de la DCO.

Certains composés cycliques et un grand nombre de produits volatils (par exemple les acides gras inférieurs) ne sont pas totalement oxydés lors de l'essai.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE D'ESSAI

Préparer une solution ou une dispersion préliminaire de la substance pour obtenir une DCO de 250 à 600 milligrammes par litre.

Remarque :

Dans le cas 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.

Il est souvent avantageux, en particulier lorsqu'on a affaire à des substances peu solubles, de déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) à l'aide d'une variante de la méthode, c'est-à-dire dans un système clos muni d'un régulateur de pression (H. Kelkenberg, 1975). Cette modification permet souvent de parvenir à quantifier des substances qui le sont difficilement en utilisant la méthode classique — par exemple l'acide acétique. Toutefois cette méthode échoue elle aussi dans le cas de la pyridine. Le fait d'augmenter jusqu'à une valeur 0,25 N (0,0416 M) la concentration de bichromate de potassium prescrite dans la référence (1) facilite la pesée directe d'une quantité de substance comprise entre 5 et 10 mg, ce qui est essentiel pour déterminer la DCO de substances faiblement hydrosolubles (réf. 2).

Dans les autres cas, déterminer la DCO en suivant toute méthode normalisée nationale ou internationale.

2. EVALUATION DES DONNEES

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.

(*) (Afin d'éviter la dissémination de mercure dans l'environnement, les solutions contenant des sels de mercure doivent être traitées après utilisation.)

3. RESULTATS

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. REFERENCES

1) Kelkenberg, H..Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

2) Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Exemples de méthodes normalisées :

NBN T 91-201 Détermination 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 Détermination of the chemical oxygen demand.

analysis

DIN 38409-H-41 Détermination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg par litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality : chemical oxygen demand dichromate methods

C.7. DEGRADATION ABIOTIQUE — HYDROLYSE EN FONCTION DU pH

1. METHODE

La méthode décrite est basée sur 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 aux substances peu biodégradables et elle peut faire varier la persistance d'une substance dans l'environnement.

La plupart des réactions d'hydrolyse sont de *pseudo*-premier ordre et c'est pourquoi 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, 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 n'est applicable qu'aux substances hydrosolubles. Les impuretés peuvent 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. DEFINITIONS ET UNITES

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 donné par la relation:

$$\text{vitesse} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad [2]$$

Du 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:

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [3]$$

Cette constante peut être déterminée pour une valeur de pH et une température T, en utilisant l'expression:

$$k_{\text{obs}} = \frac{2,303}{t} \times \log \frac{C_0}{C_t} \quad [4]$$

où:

t = temps,

C₀ = concentration de la substance au temps 0,

C_t = concentration de la substance au temps t,

2,303 = facteur de conversion des logarithmes népériens en logarithmes décimaux.

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:

$$C_t = \frac{1}{2} \cdot C_0 \quad [5]$$

A partir des expressions [4] et [5], on peut démontrer que;

$$t_{\frac{1}{2}} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad [6]$$

1.3. SUBSTANCES DE REFERENCE

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.

Les substances suivantes ont été utilisées comme substance de référence (1) :

Acide acétylsalicylique (aspirine)

0,0-diéthyl 0-2 isopropyl-4-méthyl-6 pyrimidyl thiophosphate (Dimpylate, Diazinon).

1.4. PRINCIPE DE LA METHODE

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 à l'aide de 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 à partir de la pente de la droite (voir point 2).

Lorsqu'il n'est pas possible de déterminer directement 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. La droite du logarithme de la constante de vitesse telle que déterminée à température appropriée en fonction de l'inverse de la température absolue (k), permet d'extrapoler la valeur de la constante de vitesse qu'il n'était pas possible d'obtenir directement.

1.5. CRITERES DE QUALITE

La référence (2) rapporte que des mesures de constante de vitesse d'hydrolyse pour 13 classes de structures organiques peuvent être d'une grande précision.

La répétabilité dépend, en particulier, du contrôle du pH et de la température et peut être influencée par la présence de micro-organismes et, dans certains cas, par la concentration en oxygène dissous.

1.6. DESCRIPTION DE LA METHODE

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.

A cette fin, des solutions tampon doivent être préparées en utilisant des réactifs chimiques de pureté analytique et de l'eau distillée ou déionisée stérile. Quelques exemples de solutions tampon sont présentés dans l'annexe.

La solution tampon utilisée peut influencer la vitesse d'hydrolyse; si cela s'avère être 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 tampon 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 doit pas dépasser 0,01 M ou la moitié de la concentration de saturation (la plus faible des deux).

L'utilisation des solvants organiques miscibles dans l'eau est seulement recommandée pour des substances ayant une faible solubilité dans l'eau.

La quantité du solvant doit être inférieure à 1% et ne doit pas interférer avec le processus hydrolytique.

1.6.2. Appareillage

Des fioles fermées en verre doivent être employées, mais l'utilisation de graisse sur les rodages est à éviter.

Si la substance ou le tampon utilisé est volatil, ou si l'essai est mené à haute température, on préférera des tubes scellés ou fermés et remplis le plus complètement possible.

1.6.3. Méthode analytique

La méthode utilisée doit être spécifique pour permettre de déterminer la substance à étudier aux concentrations utilisées au cours de l'essai et peut combiner quelques méthodes analytiques appropriées.

La méthode analytique dépendra de la nature de la substance et doit être suffisamment précise et sensible pour détecter une diminution de 10 % de la concentration initiale.

1.6.4. Conditions de l'essai

Les essais seront menés en utilisant une enceinte thermostatique contrôlée ou un bain à température constante fixée à $\pm 0,5$ °C de la température choisie. La température sera maintenue et mesurée avec une précision de $\pm 0,1$ °C. Les interférences photolytiques devront être évitées par des moyens appropriés.

Pour les substances facilement oxydables, il sera nécessaire d'éliminer l'oxygène dissous (par exemple par barbotage d'azote ou d'argon pendant 5 minutes avant de préparer les solutions).

1.6.5. Procédure d'essai

Essai préliminaire

Pour toutes les substances, un essai préliminaire doit être conduit à $50 \pm 0,5$ °C à 3 valeurs de pH : 4,0, 7,0 et 9,0. On effectuera 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 de celles de l'environnement (25 °C).)

Si l'essai préliminaire montre 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 1

L'essai 1 est mené à une température unique, de préférence à $50 \pm 0,5$ °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) devra 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 1 a été effectué, l'ordre de la réaction est déterminé.

Estimation de la constante de vitesse à 25 °C :

La décision du choix de procédé expérimental dépend du fait qu'il est possible de conclure de l'essai 1 que la réaction est ou n'est pas de pseudo-premier ordre.

S'il n'est pas possible de conclure avec certitude au cours de l'essai 1 que la réaction est de pseudo-premier ordre, les expériences doivent être poursuivies, telles qu'elles sont décrites dans l'essai 2.

Si la détermination du pseudo-premier ordre de l'essai 1 est fiable, les expériences doivent être poursuivies selon la description de l'essai 3 [ou bien, il est possible, dans certaines circonstances, de calculer la constante de vitesse à 25 °C à partir des constantes déterminées à 50 °C, calculées en utilisant les résultats de l'essai 1 (voir point 3.2)].

1.6.5.3. Essai 2

Cet essai est effectué pour chaque pH pour lequel il a été établi dans l'essai 1 qu'il était nécessaire de poursuivre les expériences :

- soit à une température choisie, inférieure à 40 °C,
- soit à deux températures, supérieures à 50 °C, ayant entre elles un écart d'au moins 10 °C.

Pour chaque valeur de pH et de température pour lesquelles l'essai 2 est effectué, au moins six points espacés de manière appropriée sont mesurés de telle sorte que les pourcentages d'hydrolyse se trouvent dans l'intervalle compris entre 20 et 70 %.

Pour une valeur de pH et une température, une double détermination est effectuée. Lorsque l'essai 2 est pratiqué à deux températures supérieures à 50 °C, la double détermination est effectuée de préférence à la plus basse des deux températures.

Pour chaque valeur de pH et de température pour lesquelles l'essai 2 est effectué, une estimation graphique du temps de demi-vie ($t_{\frac{1}{2}}$) sera donnée, lorsque cela est possible.

1.6.5.4. Essai 3

Cet essai est effectué pour chaque valeur de pH pour laquelle les résultats de l'essai 1 en ont montré la nécessité :

- soit à une température inférieure à 40 °C,
- soit à deux températures, supérieures à 50 °C et espacées d'au moins 10 °C.

Pour chaque valeur de pH et de température pour lesquelles l'essai 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 valeur de la constante k_{obs} ainsi que la valeur de $t_{\frac{1}{2}}$ doivent être calculés.

2. EVALUATION DES DONNEES

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 obtenues à partir du graphique des logarithmes des concentrations en fonction du temps, en utilisant l'expression :

$$k_{obs} = - \text{pente} \times 2,303 \quad [7]$$

De plus, $t_{\frac{1}{2}}$ peut être calculé selon l'équation [6].

Estimer $k_{25\text{ °C}}$ en appliquant l'équation d'Arrhénius, s'il y a lieu.

Dans le cas où le comportement n'est pas de *pseudo-premier* ordre, voir point 3.1.

3. RESULTATS**3.1. PROCES-VERBAL D'ESSAI**

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

- les spécifications de la substance;
- tout résultat obtenu avec des substances de référence;
- le principe et la description détaillée de la méthode analytique utilisée;
- pour chaque essai : la température, la valeur du pH, la composition du tampon et un tableau rassemblant tous les points expérimentaux concentration-temps;
- dans le cas des réactions de pseudo-premier ordre, les valeurs de K_{obs} de $t_{\frac{1}{2}}$ ainsi que leur méthode de calcul;
- dans le cas d'une réaction qui n'est pas de pseudo-premier ordre, établir le graphique des logarithmes des concentrations en fonction du temps;
- toute information et observation nécessaires à l'interprétation des résultats.

3.2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Il est parfois possible de calculer des valeurs acceptables de la constante de vitesse (à 25 °C) de substances d'essai, à condition que les 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. REFERENCES

- (1) OCDE, Paris, 1981, Ligne directrice n° 111, Décision du Conseil C(81) 30 final.
- (2) W. Mabey and T. Mill, « Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions, » J. Phys. Chem. Ref., 1978, Data 7 vol. (2), 383-415.

Annexe

Mélanges tampons**A. CLARK ET LUBS**

Les valeurs de pH indiquées dans ce tableau ont été calculées à partir de mesures potentielles utilisant les équations standard de Sørensen. Les valeurs réelles de pH sont de 0,04 unité plus élevées que les valeurs du tableau.

Composition	pH
0,1 M de phthalate de potassium hydrogène + 0,1 N HCl à 20 °C	
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml de phthalate, compléter à 100 ml	3,8
0,1 M de phthalate de potassium hydrogène + 0,1 N NaOH à 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phthalate, compléter à 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phthalate, compléter à 100 ml	4,2
0,1 M de phosphate monopotassique + 0,1 N NaOH à 20 °C	
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phosphate, compléter à 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de phosphate, compléter à 100 ml	7,0
35,00 ml 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 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml d'acide borique, compléter à 100 ml	9,2

B. KOLTHOFF ET VLEESCHOUER

Composition	pH
0,1 M de citrate monopotassique et 0,1 N NaOH à 18 °C (ajouter un petit cristal de thymol pour éviter la croissance des moisissures)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml de citrate, compléter à 100 ml	4,2

C. SØRENSEN

0,05 M borax + 0,1 N HCl

Composition		pH			
Borax (ml)	HCl (ml)	Sørensen 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			
Borax (ml)	NaOH (ml)	Sørensen 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

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPOLe Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTELe Ministre de la Santé publique,
M. COLLALa Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMETLe Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTENLe Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Bijlage VI

Algemene criteria voor de indeling en het kenmerken van gevaarlijke stoffen en preparaten

1. ALGEMENE INLEIDING

1.1. Het hoofddoel van de indeling is alle fysisch-chemische, toxicologische en ecotoxicologische eigenschappen van een stof die bij normaal gebruik een gevaar kunnen opleveren, aan te duiden. Nadat (een) gevaarlijke eigenschap(en) is/zijn vastgesteld dient de stof of het preparaat om het (de) gevaar (gevaren) aan te geven, te worden gekenmerkt volgens een erkende procedure ten einde de gebruiker, het grote publiek en het milieu te beschermen.

1.2. In deze bijlage worden de grondbeginselen behandeld voor het indelen en het kenmerken van stoffen en preparaten, die worden genoemd in artikel 3, § 3 van dit besluit en in artikel 5, van het K.B. van 11 januari 1993 andere relevante besluiten inzake gevaarlijke preparaten.

Zij is bedoeld voor een ieder (fabrikant, importeur, nationale overheden) die betrokken is bij de indeling en het kenmerken van gevaarlijke stoffen en preparaten.

1.3. De voorschriften van dit besluit en van het K.B. van 11 januari 1993 beogen het grote publiek en beroepsmatig betrokkenen op wezenlijke punten voorlichting te geven over gevaarlijke stoffen en preparaten. Het etiket vestigt de aandacht van degenen die met stoffen en preparaten omgaan, op de gevaren van sommige van deze materialen.

Het etiket kan tevens de aandacht vestigen op elders beschikbare, meer uitgebreide informatie over de veiligheid en het gebruik van produkten.

1.4. In de vermeldingen op het etiket is rekening gehouden met alle mogelijke gevaren bij normaal gebruik van gevaarlijke stoffen en preparaten in de vorm waarin zij in de handel zijn gebracht, maar niet noodzakelijk ten aanzien van elke andere uiteindelijke gebruiksvorm, bij voorbeeld in verdunde toestand. De ernstige gevaren worden aangegeven met symbolen; daarnaast worden niet alleen deze gevaren maar ook die welke voortvloeien uit andere gevaarlijke eigenschappen aangeduid met waarschuwingssymbolen, terwijl in veiligheidsaanbevelingen aanwijzingen worden gegeven voor de noodzakelijke voorzorgsmaatregelen.

Bij stoffen wordt de informatie aangevuld met de naam van de stof volgens een internationaal erkende chemische stoffen nomenclatuur, waarbij de in de Europese inventaris van de in de handel bestaande chemische stoffen (EINECS) of de Europese lijst (ELINCS) van genotificeerde stoffen gebruikte naam de voorkeur verdient, met het EEG-nummer en met de naam, het adres en telefoonnummer van de in de Gemeenschap gevestigde persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van de stof.

Bij preparaten wordt de informatie aangevuld met de naam of de handelsnaam van het preparaat, de scheikundige benaming van de in het preparaat aanwezige stoffen overeenkomstig artikel 9, § 1, onder c) van het K.B. van 11 januari 1993 en de naam, het adres en het telefoonnummer van de in de Gemeenschap gevestigde persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen van het preparaat.

1.5. Op grond van artikel 3, § 4 van dit besluit dienen fabrikanten van, handelaars in en importeurs van gevaarlijke stoffen die wel in EINECS, maar nog niet in bijlage I zijn opgenomen, een onderzoek in te stellen ten einde kennis te nemen van de bestaande relevante en toegankelijke gegevens betreffende de eigenschappen van die stoffen. Aan de hand van die gegevens moeten zij die stoffen verpakken en voorlopig kenmerken overeenkomstig de artikelen 7 en 8 en de criteria van deze bijlage.

1.6. Voor stoffen kunnen de voor de indeling en het kenmerken benodigde gegevens als volgt worden verkregen :

a) als het gaat om stoffen, waarvoor inlichtingen volgens bijlage VII nodig zijn, komen de meeste voor de indeling en het kenmerken benodigde gegevens voor in het "basisdossier". De indeling en het kenmerken moeten, wanneer nieuwe gegevens beschikbaar komen (bijlage VIII), zo nodig worden herzien.

b) ten aanzien van de overige stoffen (bij voorbeeld de stoffen die worden bedoeld in paragraaf 1.5) kunnen de voor de indeling en het kenmerken benodigde gegevens in voorkomend geval worden ontleend aan een aantal uiteenlopende bronnen, zoals bij voorbeeld de resultaten van vroeger onderzoek, inlichtingen uit hoofde van internationale regelingen voor het vervoer van gevaarlijke stoffen, gegevens uit referentiewerken en uit de literatuur of gegevens verkregen uit praktijkervaring.

Voor preparaten kunnen de voor de indeling en het kenmerken benodigde gegevens worden verkregen :

a) als het gaat om fysisch-chemische gegevens, door toepassing van de in bijlage V van dit besluit genoemde methoden. Voor gasvormige preparaten kan voor ontvlambare en oxiderende eigenschappen een berekeningsmethode worden gebruikt (zie hoofdstuk 9);

b) als het gaat om gegevens over effecten op de gezondheid :

— door toepassing van de in bijlage V van dit besluit genoemde methoden en/of door toepassing van de in artikel 5, § 5, onder a) tot en met i), van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde conventionele methode;

— maar wanneer het de beoordeling van kankerverwekkende, mutagene of voor de voortplanting giftige eigenschappen betreft, door toepassing van de in artikel 5, § 5, onder j) tot en met q), van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde conventionele methode.

Opmerking betreffende de uitvoering van dierproeven

Bij de uitvoering van dierproeven voor het verkrijgen van experimentele gegevens gelden de bepalingen van het K.B. van 14 november 1993 betreffende de bescherming van proefdieren.

1.7. Toepassing van de criteria

De indeling moet zowel de toxicologische als de fysisch-chemische eigenschappen van stoffen en preparaten alsmede de ecotoxicologische eigenschappen van stoffen omvatten.

Het indelen van stoffen en preparaten geschiedt op basis van de criteria van de hoofdstukken 2 tot en met 4 en additioneel voor stoffen eveneens op basis van hoofdstuk 5 van deze bijlage. Alle soorten gevaren moeten in beschouwing worden genomen; indeling bij voorbeeld onder 3.2.1 betekent dus niet dat met de onderdelen 3.2.2 of 3.2.4 geen rekening hoeft te worden gehouden.

De keuze van symbolen en waarschuwingssymbolen geschiedt op basis van de indeling om ervoor te zorgen dat de specifieke aard van de bij de indeling vastgestelde mogelijke gevaren op het etiket wordt weergegeven.

Onverminderd de criteria van 2.2.3, 2.2.4 en 2.2.5 gelden voor stoffen en preparaten in aerosolvorm de criteria voor ontvlambaarheid genoemd in artikel 1, 9° en in artikel 3, § 1, f, van het K.B. van 14 april 1978 betreffende aerosols.

1.7.1. Definities

« Stoffen » zijn chemische elementen en hun verbindingen, zoals zij voorkomen in natuurlijke toestand of bij de productie ontstaan, met inbegrip van alle additieven die nodig zijn voor het behoud van de stabiliteit van het produkt en alle onzuiverheden ten gevolge van het productieproces, doch met uitzondering van elk oplosmiddel dat kan worden afgescheiden zonder dat de stabiliteit van de stof wordt aangetast of de samenstelling ervan wordt gewijzigd.

Een stof kan chemisch duidelijk omschreven (bij voorbeeld aceton) dan wel een complex mengsel van bestanddelen van uiteenlopende samenstelling (bij voorbeeld aromatische distillaten) zijn. Bij een aantal complexe stoffen zijn bepaalde afzonderlijke bestanddelen geïdentificeerd.

« Preparaten » zijn mengsels of oplossingen uit twee of meer stoffen.

1.7.2. Toepassing van de criteria voor stoffen

De in deze bijlage genoemde criteria zijn rechtstreeks van toepassing wanneer de gegevens zijn verkregen met behulp van testmethoden vergelijkbaar met de testmethoden van bijlage V. In andere gevallen moeten de beschikbare gegevens worden beoordeeld door vergelijking van de gebruikte testmethoden met de testmethoden van bijlage V en met de in de onderhavige bijlage gegeven regels voor het bepalen van de juiste criteria voor de indeling en het kenmerken.

1.7.2.1. Indeling van stoffen die onzuiverheden, additieven of afzonderlijke bestanddelen bevatten

Wanneer in stoffen onzuiverheden, additieven of afzonderlijke bestanddelen zijn geïdentificeerd, worden die stoffen in beschouwing genomen als de concentratie van die onzuiverheden, additieven of afzonderlijke bestanddelen gelijk of hoger is dan :

— 0,1 % voor stoffen die als zeer vergiftige of vergiftige (categorie 1 of 2), kankerverwekkende (categorie 1 of 2), mutagene (categorie 1 of 2) of voor de voortplanting vergiftige (categorie 1 of 2) stoffen zijn ingedeeld;

— 1 % voor stoffen die als schadelijk, bijtend, irriterend, sensibiliserend, kankerverwekkende (categorie 3), mutagene (categorie 3) of voor de voortplanting vergiftige (categorie 3) stoffen zijn ingedeeld; tenzij in bijlage I van dit besluit lagere waarden worden opgegeven.

Met uitzondering van de stoffen die specifiek in bijlage I worden genoemd, dient de indeling op basis van fysisch-chemische eigenschappen en gezondheidsrisico's volgens de bepalingen van artikel 5 en het kenmerken volgens de bepalingen van artikel 9 van het K.B. van 11 januari 1993 te verlopen.

De indeling op basis van fysisch-chemische eigenschappen verloopt volgens de criteria van hoofdstuk 2, en de indeling op basis van milieu-effecten verloopt volgens de criteria van hoofdstuk 5 van deze bijlage.

Voor asbest (650-013-00-6) geldt deze algemene regel pas als er in bijlage I een concentratiegrens is vastgesteld. Stoffen die asbest bevatten, moeten worden ingedeeld en gekenmerkt overeenkomstig de bepalingen van artikel 3, § 4 van dit besluit.

1.7.3. Toepassing van de criteria voor preparaten

De in deze bijlage genoemde criteria zijn rechtstreeks van toepassing wanneer de gegevens zijn verkregen met behulp van testmethoden vergelijkbaar met de testmethoden van bijlage V, met uitzondering van die criteria van hoofdstuk 4 waarvoor alleen de conventionele methode geldt. In andere gevallen moeten de beschikbare gegevens worden beoordeeld door vergelijking van de gebruikte testmethoden met de testmethoden van bijlage V en met de in de onderhavige bijlage gegeven regels voor het bepalen van de juiste indeling en het kenmerken.

Wanneer de gevaren voor de gezondheid worden beoordeeld door toepassing van de in artikel 5, § 5, van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde conventionele methode, moeten de afzonderlijke concentratiegrenzen worden gebruikt die worden vermeld in :

— hetzij bijlage I van dit besluit;

— hetzij bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder de bijbehorende concentratiegrenzen.

Voor preparaten die gasmengsels bevatten, geschiedt de indeling in verband met de effecten op de gezondheid met behulp van de berekeningsmethode op basis van de afzonderlijke concentratiegrenzen uit bijlage I van dit besluit of, wanneer die niet in bijlage I voorkomen, op basis van de criteria van bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993.

1.7.3.1. Preparaten of in 1.7.2.1 beschreven stoffen die worden gebruikt als bestanddelen van een ander preparaat

Dergelijke preparaten moeten conform de bepalingen van artikel 9 overeenkomstig de in artikel 5 van het K.B. van 11 januari 1993 vermelde voorwaarden worden gekenmerkt. In bepaalde gevallen zijn de gegevens op het etiket van het preparaat of de in 1.7.2.1 beschreven stof evenwel onvoldoende om andere fabrikanten, die het als bestanddeel van hun eigen preparaat (preparaten) gebruiken, in staat te stellen hun preparaat (preparaten) correct in te delen en te kenmerken.

In die gevallen dient de in de Europese Gemeenschap gevestigde persoon die voor het in de handel brengen van het oorspronkelijke preparaat of de in 1.7.2.1 beschreven stof verantwoordelijk is, of het nu de fabrikant, de importeur of de distributeur is, op gerechtvaardigd verzoek en zo snel mogelijk alle noodzakelijke gegevens over de aanwezige gevaarlijke stoffen te verstrekken ten einde een correcte indeling en etikettering van het nieuwe preparaat mogelijk te maken. Deze gegevens zijn ook nodig om de persoon die voor het in de handel brengen van het nieuwe preparaat verantwoordelijk is in staat te stellen aan andere eisen van het K.B. van 11 januari 1993 te voldoen.

2. INDELING OP BASIS VAN FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN

2.1. Inleiding

De in bijlage V van dit besluit opgenomen testmethoden met betrekking tot de ontplofbare, de ontvlambare en de oxiderende eigenschappen dienen tot nadere uitwerking van de definities van artikel 1, § 4, onder a) tot en met e). De criteria vloeien rechtstreeks voort uit de testmethoden van bijlage V, voor zover die daar zijn vermeld.

Indien er voldoende aanwijzingen zijn dat de fysisch-chemische eigenschappen van de stoffen en preparaten — met uitzondering van organische peroxiden — in de praktijk afwijken van het resultaat volgens de testmethoden van bijlage V, dan worden deze stoffen en preparaten ingedeeld overeenkomstig hun eventuele gevaren voor degenen die met deze stoffen en preparaten omgaan of voor andere personen.

2.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingszinnen

Bij preparaten dienen de in artikel 5, § 2, van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde criteria in beschouwing te worden genomen.

2.2.1. Ontploffbaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld, als ontploffbaar en gekenmerkt met symbool E en de gevaarsaanduiding "ontploffbaar" overeenkomstig de resultaten van de testen van bijlage V en in zoverre de stoffen en preparaten ontploffbaar zijn in de vorm waarin zij in de handel worden gebracht. Eén waarschuwingzin is verplicht en de keuze ervan wordt bepaald aan de hand van het onderstaande :

R2 Ontploffingsgevaar door schok, wrijving, vuur of andere ontstekingsoorzaken

— stoffen en preparaten, doch met uitzondering van de hieronder genoemde.

R3 Ernstig ontploffingsgevaar door schok, wrijving, vuur of andere ontstekingsoorzaken

— bijzonder gevoelige stoffen en preparaten zoals zouten van pikrinezuur of PETN.

2.2.2. Oxiderend

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als oxiderend en gekenmerkt met symbool O en de gevaarsaanduiding "oxiderend" overeenkomstig de resultaten van de testen van bijlage V. Eén waarschuwingzin is verplicht en de keuze ervan wordt bepaald aan de hand van de testresultaten, met de onderstaande beperkingen :

R7 Kan brand veroorzaken

— organische peroxiden, die ook zonder in contact te komen met andere brandbare stoffen ontvlambare eigenschappen hebben.

R8 Bevordert de ontbranding van brandbare stoffen

— andere oxiderende stoffen en preparaten, inclusief anorganische peroxiden die bij contact met brandbaar materiaal brand kunnen veroorzaken of de kans op brand kunnen verhogen.

R9 Ontploffingsgevaar bij menging met brandbare stoffen

— andere stoffen en preparaten, inclusief anorganische peroxiden, die ontploffbaar worden na menging met brandbaar materiaal zoals bepaalde chloraten.

2.2.2.1. Opmerkingen betreffende peroxiden

De bestaande methoden van bijlage V kunnen niet op organische peroxiden worden toegepast om oxiderende eigenschappen aan te tonen.

Als het gaat om stoffen worden organische peroxiden ingedeeld als oxiderend op grond van hun structuur (bijvoorbeeld R-O-O-H of R₁-O-O-R₂).

Preparaten worden ingedeeld aan de hand van de in 9.3 besproken berekeningsmethode die is gebaseerd op de aanwezigheid van actieve zuurstof.

Een organische peroxide of een preparaat daarvan wordt ingedeeld als oxiderend wanneer het peroxide of zijn formulering :

— meer dan 5 % organische peroxiden bevat, of

meer dan 0,5 % beschikbare zuurstof uit organische peroxiden en niet meer dan 5 % waterstofperoxide bevat.

2.2.3. Zeer licht ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als zeer licht ontvlambaar en gekenmerkt met het symbool F+ en de gevaarsaanduiding "zeer licht ontvlambaar" overeenkomstig de resultaten van de testen van bijlage V. De waarschuwingzin wordt toegekend volgens de volgende criteria :

R12 Zeer licht ontvlambaar

— vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt lager dan 0 °C en een kookpunt (of het beginpunt van een kooktraject) gelijk aan of lager dan 35 °C;

— gasvormige stoffen en preparaten die bij normale temperatuur en druk aan de lucht blootgesteld kunnen ontbranden.

2.2.4. Licht ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als licht ontvlambaar en gekenmerkt met symbool F en de gevaarsaanduiding "licht ontvlambaar" overeenkomstig de resultaten van de testen van bijlage V. Waarschuwingzinnen worden toegekend volgens de volgende criteria :

R11 Licht ontvlambaar

— vaste stoffen en preparaten, die na kortstondig contact met een ontstekingsbron gemakkelijk kunnen ontbranden en die na verwijdering van de ontstekingsbron blijven branden of gloeien;

— vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt beneden 21 °C, die echter niet zeer licht ontvlambaar zijn.

R15 Vormt zeer licht ontvlambaar gas in contact met water

— stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht een gevaarlijke hoeveelheid zeer licht ontvlambaar gas ontwikkelen met een minimumsnelheid van 1 l/kg/h.

R17 Spontaan ontvlambaar in lucht

— stoffen en preparaten die zonder toevoer van energie bij normale temperatuur aan de lucht, in temperatuur kunnen stijgen en tenslotte kunnen ontbranden.

2.2.5. Ontvlambaar

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als ontvlambaar overeenkomstig de resultaten van de testen van bijlage V. De waarschuwingzinnen worden toegekend volgens onderstaande criteria :

R10 Ontvlambaar

— vloeibare stoffen en preparaten met een vlampunt hoger dan of gelijk aan 21 °C en lager dan of gelijk aan 55 °C.

In de praktijk is echter gebleken, dat preparaten met een vlampunt gelijk aan of hoger dan 21 °C en lager dan of gelijk aan 55 °C niet behoeven te worden ingedeeld als ontvlambaar, indien deze preparaten op geen enkele wijze de verbranding kunnen onderhouden en alleen zolang er geen reden is om gevaren te vrezen voor degenen die met deze preparaten omgaan of voor andere personen.

2.2.6. Andere fysisch-chemische eigenschappen

Aan de stoffen en preparaten die op grond van 2.2.1 tot en met 2.2.5 of hoofdstukken 3, 4 en 5 zijn ingedeeld worden aanvullende waarschuwingzinnen toegekend overeenkomstig de volgende criteria (gebaseerd op ervaring verkregen bij het samenstellen van bijlage 1) :

R1 In droge toestand ontplofbaar

Ontplofbare stoffen en preparaten die als oplossing of in vochtige toestand in de handel worden gebracht; bij voorbeeld nitrocellulose met meer dan 12,6 % stikstof.

R4 Vormt met metalen zeer gemakkelijk ontplofbare verbindingen

Stoffen en preparaten die gevoelige ontplofbare metaalverbindingen kunnen vormen; bij voorbeeld pikrinezuur, styfninezuur.

R5 Ontploffingsgevaar door verwarming

Stoffen en preparaten die niet bestand zijn tegen warmte en niet zijn ingedeeld als ontplofbaar; bij voorbeeld nitromethaan, perchloorzuur in concentratie groter dan 50 %.

R6 Ontplofbaar met en zonder lucht

Stoffen en preparaten die bij kamertemperatuur niet stabiel zijn; bij voorbeeld acetyleen.

R7 Kan brand veroorzaken

Reactieve stoffen en preparaten; bij voorbeeld fluor, natriumdithioniet.

R14 Reageert heftig met water

Stoffen en preparaten die heftig met water reageren; bij voorbeeld acetylchloride, alkalimetalen, titaantetrachloride.

R16 Ontploffingsgevaar bij menging met oxiderende stoffen

Stoffen en preparaten die explosief reageren met oxidatiemiddelen; bij voorbeeld rode fosfor.

R18 Kan bij gebruik een ontvlambaar/ontplofbaar damp-luchtmengsel vormen

Preparaten die zelf niet als ontvlambaar zijn ingedeeld maar die aan de lucht ontvlambare vluchtige bestanddelen bevatten.

R19 Kan ontplofbare peroxiden vormen

Stoffen en preparaten die tijdens opslag peroxiden kunnen vormen; bij voorbeeld diethylether, 1,4-dioxaan.

R30 Kan bij gebruik licht ontvlambaar worden

Preparaten, als zodanig niet als ontvlambaar ingedeeld, die echter door het ontstaan van niet-ontvlambare vluchtige bestanddelen ontvlambaar kunnen worden.

R44 Ontploffingsgevaar bij verwarming in afgesloten toestand

Stoffen en preparaten, als zodanig volgens 2.2.1 niet als ontplofbaar ingedeeld, die echter in de praktijk, bij verhitting in voldoende afgesloten toestand explosief gedrag kunnen vertonen. Zo zullen bepaalde stoffen die bij verhitting in een stalen vat explosief ontlede dit in minder stevige verpakking niet doen.

Zie voor andere aanvullende waarschuwingzinnen paragraaf 3.2.7.

3. INDELING OP BASIS VAN TOXICOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN

3.1. Inleiding

3.1.1. De indeling heeft zowel betrekking op de acute als op de chronische effecten van stoffen en preparaten hetzij als gevolg van een enkele blootstelling hetzij als gevolg van een herhaalde of langdurige blootstelling.

Indien er voldoende aanwijzingen zijn dat het toxische effect van stoffen en preparaten voor de mens in de praktijk verschilt van het effect dat op grond van dierproeven of toepassing van de conventionele methode van artikel 5, § 5, van het K.B. van 11 januari 1993 is verondersteld, dan worden deze stoffen en preparaten ingedeeld naar gelang van hun toxiciteit voor de mens. Proeven op mensen dienen echter te worden ontmoedigd en mogen normalerwijze niet worden gebruikt om positieve gegevens op grond van dierproeven te ontcrachten.

3.1.2. Stoffen worden op basis van de beschikbare experimentele gegevens ingedeeld overeenkomstig de volgende criteria waarbij rekening wordt gehouden met de belangrijkheid van deze effecten :

a) voor acute toxiciteit (letale en onherstelbare effecten na een enkele blootstelling) moeten de criteria van de paragrafen 3.2.1 tot en met 3.2.3 worden gebruikt;

b) voor subacute, subchronische of chronische toxiciteit moeten de criteria van de paragrafen 3.2.2 tot en met 3.2.4 worden gebruikt;

c) voor bijtende en irriterende effecten moeten de criteria van de paragrafen 3.2.5 en 3.2.6 worden gebruikt;

d) voor overgevoeligheidseffecten moeten de criteria van paragraaf 3.2.7 worden gebruikt;

e) voor bepaalde bijzondere effecten op de gezondheid (kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige effecten) moeten de criteria in hoofdstuk 4 worden gebruikt.

3.1.3. Voor preparaten geschiedt de indeling wat gevaren voor de gezondheid betreft :

a) op basis van de in artikel 5, § 5, van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde conventionele methode bij afwezigheid van experimentele gegevens. In dit geval is de indeling gebaseerd op de afzonderlijke concentratiegrenzen uit :

— hetzij bijlage I van dit besluit;

— hetzij bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993 wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I van dit besluit voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder de bijbehorende concentratiegrenzen;

b) of, wanneer experimentele gegevens wel beschikbaar zijn, op basis van de criteria van 3.1.2, met uitzondering van de in 3.1.2 onder e) genoemde kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige eigenschappen die met de conventionele methode van artikel 5, § 5, onder j) tot en met q) van het K.B. van 11 januari 1993 moeten worden beoordeeld.

Ongeacht de methode die voor de beoordeling van het gevaar van een preparaat wordt gebruikt moeten alle in bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993 genoemde gevaarlijke effecten voor de gezondheid in beschouwing worden genomen.

3.1.4. Wanneer de indeling dient te geschieden aan de hand van de resultaten van dierproeven, dan moeten de resultaten van de proeven een juiste weerspiegeling vormen van de gevaren voor de mens, willen deze resultaten voor de mens geldig zijn.

3.1.5. De acute orale toxiciteit van een in de handel gebrachte stof of in de handel gebracht preparaat kan worden vastgesteld aan de hand van een LD₅₀ test dan wel door bepaling van de discriminerende dosis (vaste-dosismethode).

De discriminerende dosis is de dosis die evidente toxiciteit maar niet de dood veroorzaakt. Het moet één van de vier dosisniveaus zijn die in bijlage V wordt gespecificeerd (5, 50, 500 of 2000 mg per kg lichaamsgewicht).

Het begrip "evidente toxiciteit" wordt gebruikt om toxische effecten na toediening van de teststof aan te duiden die zo ernstig zijn dat blootstelling aan het volgende hogere vaste-dosisniveau waarschijnlijk de dood tot gevolg heeft.

De testresultaten bij een bepaalde dosis kunnen bestaan uit :

- minder dan 100 % overlevende dieren;
- 100 % overlevende dieren, doch evidente intoxicatie;
- 100 % overlevende dieren, doch geen evidente intoxicatie.

De testmethode impliceert dat als niet eerder op het geschikte dosisniveau getest is er in bepaalde gevallen bij hogere of lagere dosisniveaus moet worden getest. Raadpleeg ook de evaluatie van de testmethode B1bis van bijlage V.

Bij de criteria in de paragrafen 3.2.1, 3.2.2 en 3.2.3 wordt alleen het eindresultaat vermeld. De dosis van 2000 mg/kg dient in eerste instantie te worden gebruikt om informatie te verkrijgen over de toxische effecten van stoffen met een lage acute toxiciteit die niet op basis van acute toxiciteit zijn ingedeeld.

3.2. Criteria voor de indeling, keuze van symbolen, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingssymbolen

3.2.1. Zeer vergiftig

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als zeer vergiftig en gekenmerkt met symbool T + en de gevaarsaanduiding "zeer vergiftig" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria.

Waarschuwingssymbolen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R28 Zeer vergiftig bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

- LD₅₀, oraal, rat : ≤ 25 mg/kg;
- discriminerende dosis, oraal, rat 5 mg/kg : minder dan 100 % overlevende dieren bij 5 mg/kg oraal, rat, vaste-dosismethode.

R27 Zeer vergiftig bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

- LD₅₀, dermaal, rat of konijn : ≤ 50 mg/kg.

R26, Zeer vergiftig bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

- LC₅₀, inhalatoir, rat, voor aerosolen of deeltjes : ≤ 0,25 mg/l/4 uur;
- LC₅₀, inhalatoir, rat, voor gassen en dampen : ≤ 0,5 mg/l/4 uur.

R39 Gevaar voor ernstige onherstelbare effecten

— sterke aanwijzingen dat een eenmalige blootstelling via een passende weg, doorgaans bij bovengenoemde doses, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade, welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven, moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

3.2.2. Vergiftig

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als vergiftig en gekenmerkt met symbool T en de gevaarsaanduiding "vergiftig" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria.

Waarschuwingssymbolen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R25 Vergiftig bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

- LD₅₀, oraal, rat : 25 < LD₅₀ ≤ 200 mg/kg;
- discriminerende dosis, oraal, rat, 5 mg/kg : 100 % overlevende dieren, doch evidente intoxicatie.

R24 Vergiftig bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

- LD₅₀, dermaal, rat of konijn : 50 < LD₅₀ ≤ 400 mg/kg.

R23 Vergiftig bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

- LC₅₀, inhalatoir, rat, voor aerosolen of deeltjes : 0,25 < LC₅₀ ≤ 1 mg/l/4 uur;
- LC₅₀, inhalatoir, rat, voor gassen en dampen : 0,5 < LC₅₀ ≤ 2 mg/l/4 uur.

R39 Gevaar voor ernstige onherstelbare effecten

— sterke aanwijzingen dat een eenmalige blootstelling via passende weg, doorgaans bij bovengenoemde doses, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade, welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven, moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48 Gevaar voor ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling

— waarschijnlijk wordt ernstige schade (duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis) veroorzaakt door herhaalde of langdurige blootstelling via een bepaalde weg;

— stoffen en preparaten worden ten minste als toxisch ingedeeld wanneer deze effecten worden waargenomen bij doses van een grootte-orde (dit wil zeggen het tienvoudige) minder dan die welke in paragraaf 3.2.3 voor R48 worden genoemd.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

3.2.3. Schadelijk

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als schadelijk en gekenmerkt met symbool Xn en de aanduiding "schadelijk" overeenkomstig de hieronder weergegeven criteria.

Waarschuwingssinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R22 Schadelijk bij opname door de mond

Resultaten acute toxiciteit :

— LD₅₀, oraal, rat : 200 ≤ LD₅₀ ≤ 2000 mg/kg;

— discriminerende dosis, oraal, rat, 50 mg/kg : 100 % overlevende dieren, doch evidente intoxicatie;

— minder dan 100 % overlevende dieren bij 500 mg/kg oraal, rat, vaste dosis-methode; raadpleeg ook de evaluatie van de testmethode *Bibis* van bijlage V.

R21 Schadelijk bij aanraking met de huid

Resultaten acute toxiciteit :

— LD₅₀, dermaal, rat of konijn : 400 ≤ LD₅₀ ≤ 2000 mg/kg.

R20 Schadelijk bij inademing

Resultaten acute toxiciteit :

— LC₅₀, inhalatoir, rat, voor aerosolen of deeltjes : 1 < LC₅₀ ≤ 5 mg/l/4 uur;

— LC₅₀, inhalatoir, rat, voor gassen en dampen : 2 ≤ LC₅₀ ≤ 20 mg/l/4 uur.

R40 Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten

— sterke aanwijzingen dat een eenmalige blootstelling via een passende weg, doorgaans bij de bovengenoemde doses, waarschijnlijk leidt tot onherstelbare schade, welke verschilt van de in hoofdstuk 4 bedoelde effecten.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R40/20, R40/21, R40/22, R40/20/21, R40/20/22, R40/21/22, R40/20/21/22.

R48 Gevaar voor ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling

— waarschijnlijk wordt ernstige schade (duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis, veroorzaakt door herhaalde of langdurige blootstelling via een passende weg;

— stoffen en preparaten worden ten minste als schadelijk ingedeeld wanneer deze effecten worden waargenomen bij de volgende doses :

oraal, rat : ≤ 50 mg/kg (lichaamsgewicht)/dag

dermaal, rat of konijn : ≤ 100 mg/kg (lichaamsgewicht)/dag

inhalatoir, rat : ≤ 0,25 mg/l 6 uur/dag

Deze richtwaarden zijn zonder meer van toepassing wanneer ernstige beschadigingen zijn waargenomen in een subchronische toxiciteitsproef (90 dagen). Bij de interpretatie van de resultaten van een subacute toxiciteitsproef (28 dagen) moeten deze getallen met ongeveer een factor drie worden verhoogd. Wanneer de resultaten van een chronische toxiciteitsproef (2 jaar) beschikbaar zijn dan dienen deze per geval te worden beoordeeld. Indien resultaten van studies die meer dan één termijn bestrijken beschikbaar zijn, dient men in de regel de resultaten van de langste studie te gebruiken.

Om de wijze van toediening of blootstelling aan te geven moeten de volgende combinaties worden gebruikt : R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

3.2.3.1. Opmerkingen met betrekking tot zeer vluchtige stoffen

Bij bepaalde stoffen met een hoge verzadigde damp concentratie kunnen er aanwijzingen zijn voor effecten die bepaalde redenen tot bezorgdheid geven. Dergelijke stoffen kunnen niet worden ingedeeld op grond van de in deze handleiding genoemde criteria voor effecten op de gezondheid (3.2.3). Wanneer er echter passend bewijs bestaat dat deze stoffen bij normaal gebruik een gevaar vormen kan het nodig zijn om ze per geval als "schadelijk" in te delen en te voorzien van een passende waarschuwingsszin.

Zulke stoffen worden met passende concentratiegrenzen ingedeeld in bijlage I.

3.2.4. Opmerkingen met betrekking tot het gebruik van R48

Het gebruik van deze waarschuwingsszin heeft betrekking op het specifieke bereik van biologische effecten die hieronder staan omschreven. Opgemerkt moet worden dat de omschrijvingen niet corresponderen met de definities van schadelijk en toxisch in artikel 1, § 4, onder g) en h) van dit besluit. Bij gebruik van deze waarschuwingsszin wordt onder ernstige schade aan de gezondheid onder meer de dood en duidelijke functieverstoring of morfologische verandering met toxicologische betekenis verstaan. Het is vooral belangrijk wanneer deze veranderingen onherstelbaar zijn. Het is eveneens van belang niet alleen bepaalde ernstige veranderingen in een enkel orgaanstelsel of biologisch systeem in beschouwing te nemen, maar ook minder specifieke veranderingen van minder ernstige aard die betrekking hebben op verscheidene organen of drastische veranderingen in de algehele gezondheidstoestand.

Bij het beoordelen van de vraag of er sprake is van dit soort effecten dienen de volgende richtsnoeren te worden geraadpleegd :

1. aanwijzingen waaruit blijkt dat R48 moet worden toegepast :

a) met de stof verband houdende sterfgevallen;

b) i) belangrijke functionele veranderingen in het centrale of perifere zenuwstelsel, inclusief gezichtsvermogen, gehoor en reukvermogen, beoordeeld aan de hand van klinische waarnemingen of andere geschikte methoden (bij voorbeeld elektrofysiologie);

ii) belangrijke functionele veranderingen in andere orgaanstelsels (bij voorbeeld de long);

c) elke consistente verandering in de klinisch biochemische, hematologische of urine-analyse parameters die duiden op een ernstige orgaanstoornis. Hematologische stoornissen worden als uitzonderlijk belangrijk gezien wanneer aanwijzingen doen vermoeden dat zij het gevolg zijn van een verminderde productie van bloedcellen in het beenmerg;

- d) bij microscopisch onderzoek na autopsie vastgestelde ernstige orgaanbeschadigingen :
- i) wijdverspreide of ernstige necrose, fibrose of granuloomvorming in vitale organen met regeneratief vermogen (bij voorbeeld lever);
 - ii) grote morfologische veranderingen die potentieel omkeerbaar zijn maar duidelijk op een uitgesproken orgaanstoornis wijzen (bij voorbeeld ernstige vervetting van de lever, ernstige acute tubulaire nefrose in de nier, ulcererende gastritis);
 - iii) aanwijzingen voor aanzienlijke celdood in vitale organen die niet tot regeneratie in staat zijn (bij voorbeeld fibrose van het myocardium of het afsterven van een zenuw) of in stamcelpopulaties (bij voorbeeld aplasie of hypoplasie van het beenmerg);

Bovengenoemd bewijs zal doorgaans worden verkregen uit dierproeven. Wanneer aan praktijkervaring ontleende gegevens in beschouwing worden genomen, dient speciale aandacht te worden geschonken aan de blootstellingsniveaus;

2. aanwijzingen waaruit blijkt dat R48 niet moet worden toegepast :

Het gebruik van deze waarschuwingzin is beperkt tot "ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling". Bij zowel mensen als dieren kunnen een aantal met de stof verband houdende effecten worden waargenomen die het gebruik van R48 niet rechtvaardigen. Deze effecten zijn van belang wanneer wordt geprobeerd om voor een chemische stof een no-effect niveau vast te stellen. Voorbeelden van goed gedocumenteerde veranderingen die, ongeacht hun statistische significantie, normaal gesproken toekenning van R48 niet rechtvaardigen zijn :

- a) klinische waarnemingen of veranderingen in gewichtstoename, voedselconsumptie of waterinname, die een geringe toxicologische betekenis kunnen hebben maar op zichzelf geen "ernstige schade" impliceren;
- b) kleine veranderingen in de klinische biochemische, hematologische of urine-analyse parameters die van twijfelachtige of minimale toxicologische betekenis zijn;
- c) veranderingen in orgaangewichten zonder aanwijzingen voor orgaanstoornissen;
- d) adaptieve reacties (bij voorbeeld macrofaagmigratie in de long, leverhypertrofie en enzyminductie, hyperplastische reacties op irriterende stoffen); plaatselijke effecten op de huid als gevolg van herhaalde dermale toediening van een stof die beter zouden worden gekenmerkt met R38 "Irriterend voor de huid";
- e) waar een soort specifiek toxiciteitsmechanisme (bij voorbeeld via specifieke stofwisselingsroutes) is aangetoond.

3.2.5. Bijtend

Een stof of preparaat wordt als bijtend aangemerkt, indien deze stof of dit preparaat, aangebracht op de gezonde en ongeschonden huid van een proefdier, het huidweefsel van ten minste één dier over de volledige dikte aantast, in de bijlage V genoemde huidirritatietest of in een gelijkwaardige testmethode of indien het resultaat bij voorbeeld op grond van sterk zure of basische reacties te voorspellen is (pH moet 2 of kleiner of 11,5 of groter zijn. De potentiële zuur- of basecapaciteit moet ook in beschouwing worden genomen). De indeling kan worden gebaseerd op de resultaten van gevalideerde *in vitro* testen.

De stof of het preparaat wordt ingedeeld als bijtend en gekenmerkt met symbool C en de gevaarsaanduiding "bijtend". Waarschuwingzinnen worden toegekend volgens de onderstaande criteria :

R35 Veroorzaakt ernstige brandwonden

— indien, na aanbrengen op de gezonde en ongeschonden huid van een proefdier en blootstelling gedurende ten hoogste 3 minuten, het huidweefsel over de volledige dikte wordt aangetast, of indien een dergelijk resultaat voorspelbaar is.

R34 Veroorzaakt brandwonden

— indien, na aanbrengen op de gezonde ongeschonden huid van een proefdier en blootstelling gedurende ten hoogste 4 uur, het huidweefsel over de volledige dikte wordt aangetast, of indien een dergelijk resultaat voorspelbaar is;

— organische waterstofperoxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

3.2.6. Irriterend

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als irriterend en gekenmerkt met symbool Xi en de gevaarsaanduiding "irriterend" overeenkomstig de onderstaande criteria.

3.2.6.1. Huidontsteking

De volgende waarschuwingzin wordt toegekend overeenkomstig de gegeven criteria :

R38 Irriterend voor de huid

— stoffen en preparaten die een beduidende huidontsteking veroorzaken die 24 uur of langer aanhoudt na blootstelling gedurende ten hoogste 4 uur bij konijnen volgens de huidirritatietest van bijlage V.

Een huidontsteking is beduidend :

— indien de gemiddelde waarde van de uitslag voor de vorming van erytheem en eschara of de vorming van oedeem, berekend over alle geteste dieren, 2 of hoger is,

— of, indien de test van bijlage V is uitgevoerd op drie dieren, bij ten minste twee daarvan een gemiddelde waarde van 2 of meer, berekend voor elk dier afzonderlijk, voor de vorming van erytheem en eschara of voor de vorming van oedeem is waargenomen.

In beide gevallen moeten bij elke afleestijd (24, 48, 72 uur) alle uitslagen van een effect worden gebruikt voor de berekening van de betreffende gemiddelde waarden.

Een huidontsteking is eveneens beduidend indien zij bij ten minste twee dieren aan het einde van de observatieperiode aanhoudt. Met bijzondere effecten zoals hyperplasie, schilfering, verkleuring, kloven, korsten en alopecia moet rekening worden gehouden;

— stoffen en preparaten die een beduidende huidontsteking veroorzaken, op grond van waarnemingen in de praktijk bij de mens;

— organische peroxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

Irritatie als gevolg van de ontvettende eigenschappen van een stof

Indien uit testresultaten of ervaring in de praktijk blijkt dat er sprake is van irritatie volgens de voornoemde criteria, moeten R-zinnen worden gebruikt. S-zinnen moeten worden gebruikt als er redenen zijn om aan te nemen dat de ontvettende eigenschappen van een stof irritatie bij de mens veroorzaken. Zulks dient ook te gebeuren indien niet aan voornoemde criteria wordt voldaan of een ongeschikte test is gebruikt.

3.2.6.2. Oogbeschadigingen/Oogontstekingen

De volgende waarschuwingzinnen worden eveneens toegekend volgens de gegeven criteria :

R36 Irriterend voor de ogen

— stoffen en preparaten die na aanbrengen in het oog van het dier beduidende oogbeschadigingen en/of ontstekingen veroorzaken die binnen 72 uur na de blootstelling optreden en ten minste 24 uur aanhouden.

Oogbeschadigingen en/of oogontstekingen zijn beduidend indien de gemiddelden van de oogirritatietest van bijlage V één van de volgende waarden hebben :

- opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 2 maar kleiner dan 3;
- beschadiging iris gelijk aan of groter dan 1 maar niet groter dan 1,5;
- roodheid van de bindvliesen gelijk aan of groter dan 2,5;
- oedeem van de bindvliesen (chemosis) gelijk aan of groter dan 2;

of, wanneer de test van bijlage V is uitgevoerd op drie dieren, indien bij ten minste twee daarvan de beschadigingen gelijk zijn aan één van de bovenstaande waarden, behalve dat voor beschadiging van de iris de waarde gelijk aan of groter dan 1 doch kleiner dan 2 moet zijn en voor roodheid van de bindvliesen de waarde 2,5 of hoger moet zijn.

In beide gevallen moeten bij elke afleestijd (24, 48, 72 uur) alle uitslagen van een effect worden gebruikt voor de berekening van de betreffende gemiddelde waarden;

- stoffen en preparaten die beduidende oogbeschadigingen en/of oogontstekingen veroorzaken, op grond van waarnemingen in de praktijk bij de mens.
- organische peroxiden, behalve wanneer het tegendeel kan worden bewezen.

R41 Gevaar voor ernstig oogletsel

— stoffen en preparaten die na aanbrengen in het oog van een dier ernstige oogbeschadigingen en/of oogontstekingen veroorzaken die binnen 72 uur na de blootstelling optreden en ten minste 24 uur aanhouden.

Oogbeschadigingen en/of oogontstekingen zijn ernstig indien de gemiddelden van de oogirritatietest van bijlage V één van de volgende waarden hebben :

- opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 3;
- beschadiging iris groter dan 1,5.

Hetzelfde geldt als de test is uitgevoerd op drie dieren indien deze beschadigingen en/of ontstekingen bij ten minste twee daarvan overeenkomen met één van de volgende waarden :

- opaciteit hoornvlies gelijk aan of groter dan 3;
- beschadiging iris gelijk aan 2.

In beide gevallen moeten bij elke afleestijd (24, 48, 72 uur) alle uitslagen van een effect worden gebruikt voor de berekening van de betreffende gemiddelde waarden.

Oogbeschadigingen en/of -ontstekingen zijn eveneens ernstig indien zij tot het einde van de observatieperiode aanhouden.

Tenslotte zijn zij ernstig indien de stof of het preparaat een irreversibele kleuring van de ogen veroorzaakt;

- stoffen en preparaten die beduidende oogbeschadigingen en/of oogontstekingen veroorzaken, op grond van waarnemingen in de praktijk bij de mens.

Opmerking :

Indien een stof of preparaat als bijtend wordt ingedeeld en R34 of R35 krijgt toegekend, geldt het gevaar voor ernstig oogletsel impliciet en wordt R41 niet op het etiket vermeld. Indien echter, in het geval van preparaten, met de formules in artikel 5, § 5, onder f), ii), en artikel 5, § 5, onder h), ii), van K.B. van 11 januari 1993 de som van de waarden wordt berekend, moeten stoffen die zijn ingedeeld als bijtend worden beschouwd alsof R41 is toegekend.

3.2.6.3. Irriterend voor de ademhalingswegen

De volgende waarschuwingzin wordt toegekend volgens de gegeven criteria :

R37 Irriterend voor de ademhalingswegen

- stoffen en preparaten die ernstige irritatie van de ademhalingswegen veroorzaken, doorgaans op grond van waarnemingen in de praktijk bij de mens.

3.2.7. Sensibiliserend

3.2.7.1. Overgevoeligheid bij inademing

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool Xn, de aanduiding "schadelijk" en de waarschuwingzin R42 overeenkomstig de onderstaande criteria :

R42 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij inademing

- indien in de praktijk is gebleken dat de stoffen en preparaten door inademing bij mensen in een normale populatie de frequentie van het optreden van een overgevoeligheidsreactie kunnen verhogen;
- indien de stof een isocyanaat is, tenzij is aangetoond dat de stof bij inademing geen overgevoeligheid veroorzaakt.

3.2.7.2. Overgevoeligheid bij contact met de huid

Stoffen en preparaten worden ingedeeld als sensibiliserend en gekenmerkt met het symbool Xi, de aanduiding "irriterend" en de waarschuwingzin R43 overeenkomstig de onderstaande criteria :

R43 Kan overgevoeligheid veroorzaken bij contact met de huid

— indien uit de praktijk blijkt dat de stoffen en preparaten bij een aanzienlijk aantal mensen via huidcontact een overgevoeligheidsreactie teweeg kunnen brengen, of op grond van een positieve reactie bij proefdieren.

Bij toepassing van de in bijlage V opgenomen adjuvans-testmethode voor overgevoeligheid van de huid of van andere typen testmethoden die gebruik maken van een adjuvans wordt een respons van ten minste 30 % van de dieren als positief beschouwd. Voor elke andere testmethode wordt een respons van ten minste 15 % van de dieren als positief beschouwd.

3.2.7.3. Opgemerkt wordt dat indien het symbool "Xn" en de gevaarsaanduiding "schadelijk" zijn toegekend, het symbool "Xi" en de gevaarsaanduiding "irriterend" facultatief zijn.

3.2.8. Andere toxicologische eigenschappen

Aan de stoffen en preparaten die op grond van 2.2.1 tot en met 3.2.6 en/of hoofdstukken 4 en 5 zijn ingedeeld worden aanvullende waarschuwingzinnen toegekend overeenkomstig de volgende criteria (gebaseerd op ervaring verkregen bij het samenstellen van bijlage 1).

R29 Vormt giftig gas in contact met water

Stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht een gevaarlijke hoeveelheid giftig of zeer giftig gas ontwikkelen; bijvoorbeeld aluminiumfosfide, fosforpentasulfide.

R31 Vormt giftige gassen in contact met zuren

Stoffen en preparaten die met zuur reageren en daarbij een gevaarlijke hoeveelheid giftig gas ontwikkelen; bijvoorbeeld natriumhypochloriet, bariumpolysulfide. Voor stoffen die door het grote publiek worden gebruikt is aanbeveling S50 [niet vermengen... (aan te geven door de fabrikant)] meer op zijn plaats.

R32 Vormt zeer giftige gassen in contact met zuren

Stoffen en preparaten die met zuur reageren en daarbij een gevaarlijke hoeveelheid zeer giftig gas ontwikkelen; bijvoorbeeld zouten van blauwzuur, natriumazide. Voor stoffen die door het grote publiek worden gebruikt is aanbeveling S50 [(niet vermengen... (aan te geven door de fabrikant)] meer op zijn plaats.

R33 Gevaar voor cumulatieve effecten

Stoffen en preparaten waarvoor accumulatie in het menselijk lichaam waarschijnlijk is en die aanleiding geven tot bezorgdheid die echter niet voldoende is om het gebruik van R48 te rechtvaardigen.

R64 Kan schadelijk zijn via de borstvoeding

Stoffen en preparaten die in het lichaam van de vrouw worden opgenomen en de melkafscheiding verstoren of in zodanige hoeveelheden (met inbegrip van metabolieten) in de moedermelk aanwezig zijn dat er reden is tot bezorgdheid voor de gezondheid van het kind dat de borst krijgt.

Zie voor opmerkingen met betrekking tot het gebruik van deze R-zin (en in bepaalde gevallen van R33) paragraaf 4.2.3.3.

Zie voor andere aanvullende waarschuwingzinnen paragraaf 2.2.6.

4. INDELING OP BASIS VAN BEPAALDE BIJZONDERE EFFECTEN OP DE GEZONDHEID VAN DE MENS

4.1. Inleiding

4.1.1. Procedure voor de indeling van stoffen die mogelijk de in dit hoofdstuk vermelde effecten hebben.

4.1.2. Indien een fabrikant of zijn vertegenwoordiger informatie ter beschikking heeft die erop wijst dat een stof moet worden ingedeeld en gekenmerkt volgens de criteria van de paragrafen 4.2.1, 4.2.2 of 4.2.3, moet de fabrikant of zijn vertegenwoordiger de stof voorlopig overeenkomstig deze criteria kenmerken, tenzij bij toepassing van de criteria volgens de paragrafen 3.2.1 tot en met 3.2.5 een strengere indeling noodzakelijk blijkt.

4.1.3. De fabrikant of zijn vertegenwoordiger moet bij een Lid-Staat waar de stof op de markt is gebracht zo spoedig mogelijk een document indienen waarin alle ter zake dienende informatie is samengevat. Dit document dient een bibliografie te bevatten met alle ter zake dienende referenties en zo veel mogelijk ter zake dienende niet-gepubliceerde gegevens.

4.1.4. Daarnaast dient een fabrikant of zijn vertegenwoordiger die over nieuwe gegevens beschikt die voor het indelen en kenmerken van een stof volgens de criteria van de paragrafen 4.2.1, 4.2.2 of 4.2.3 van belang zijn, deze gegevens zo snel mogelijk aan een Lid-Staat waar de stof op de markt is gebracht te verstrekken.

4.1.5. Om in de gehele Europese Gemeenschap zo spoedig mogelijk tot een uniforme indeling te komen volgens de procedure van artikel 28 van Richtlijn 67/548/EEG, dienen de Lid-Staten die beschikken over ter zake dienende informatie welke de indeling van een stof in een van deze categorieën rechtvaardigt, al of niet afkomstig van de fabrikant, deze informatie tezamen met voorstellen voor de indeling en het kenmerken, zo spoedig mogelijk aan de Commissie toe te zenden.

De Commissie brengt de overige Lid-Staten van de voorgestelde indeling en etikettering welke zij heeft ontvangen op de hoogte. Iedere Lid-Staat kan de Europese Commissie om de ingediende informatie verzoeken.

Iedere Lid-Staat die op goede gronden meent dat de voorgestelde indeling en etikettering wat betreft carcinogene, mutagene of voor de voortplanting giftige effecten onjuist is, dient de Commissie hiervan in kennis te stellen.

4.2. Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingssymbolen

4.2.1. Kankerverwekkende stoffen

Ten behoeve van de indeling en het kenmerken en met het oog op de thans beschikbare kennis, worden deze stoffen in drie categorieën onderverdeeld :

Categorie 1

Stoffen waarvan bekend is dat zij voor de mens kankerverwekkend zijn. Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan een stof en ontwikkeling van kanker.

Categorie 2

Stoffen die dienen te worden beschouwd als kankerverwekkend voor de mens. Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan een stof kan leiden tot de ontwikkeling van kanker, meestal op grond van :

- geschikte langdurige dierproeven,
- andere ter zake dienende informatie.

Categorie 3

Stoffen die in verband met hun mogelijk kankerverwekkende eigenschappen reden geven tot bezorgdheid voor de mens, waarvan de effecten door een tekort aan informatie niet voldoende kunnen worden bepaald. Er zijn aanwijzingen op grond van geschikte dierproeven, maar deze zijn niet voldoende voor indeling van de stof in categorie 2.

4.2.1.1. De volgende symbolen en waarschuwingssymbolen zijn van toepassing :

Categorie 1 en 2 :

T; R45 Kan kanker veroorzaken

Voor stoffen en preparaten waarbij alleen door inademing, bij voorbeeld in de vorm van stof, damp of rook, gevaar voor kanker bestaat (bij een andere wijze van blootstelling, bij voorbeeld opname door de mond of aanraking met de huid bestaat geen gevaar voor kanker) moeten het volgende symbool en de volgende waarschuwingssymbolen worden gebruikt :

T; R49 Kan kanker veroorzaken bij inademing

Categorie 3 :

Xn; R40 Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten.

4.2.1.2. Opmerkingen betreffende het categoriseren van kankerverwekkende stoffen

De indeling van een stof in categorie 1 geschiedt op basis van epidemiologische gegevens; die in categorie 2 en 3 hoofdzakelijk op basis van dierproeven.

Voor indeling als kankerverwekkende stof in categorie 2 moeten positieve resultaten bij twee diersoorten voorhanden zijn dan wel duidelijk positief bewijs bij één diersoort alsmede ondersteunend bewijs zoals gegevens met betrekking tot genotoxiciteit, metabolische of biochemische studies, inductie van goedaardige tumoren, een structureel verband met andere bekende kankerverwekkende stoffen of gegevens uit epidemiologische studies die op een relatie duiden.

Categorie 3 bestaat in feite uit 2 deelcategorieën :

a) stoffen die goed zijn onderzocht maar waarvoor het bewijs voor tumorinducerende effecten onvoldoende is voor indeling in categorie 2. Van aanvullende experimenten wordt niet verwacht dat zij verdere relevante informatie met betrekking tot de indeling opleveren;

b) stoffen die onvoldoende zijn onderzocht. De beschikbare gegevens zijn ontoereikend, maar geven reden tot bezorgdheid voor de mens. De indeling is voorlopig; verdere experimenten zijn nodig alvorens een definitief besluit kan worden genomen.

Voor het onderscheid tussen categorie 2 en 3 zijn de onderstaande argumenten van belang; zij beperken de betekenis van experimentele tumorinductie met betrekking tot mogelijke blootstelling van de mens. Deze argumenten, met name in combinatie, zullen in de meeste gevallen leiden tot indeling in categorie 3, zelfs wanneer er in dieren tumoren zijn geïnduceerd :

- kankerverwekkende effecten bij alleen zeer hoge dosisniveaus die de "maximaal te verdragen dosis" overschrijden. De maximaal te verdragen dosis wordt gekenmerkt door toxische effecten die, hoewel ze de levensduur nog niet verkorten, gepaard gaan met fysieke veranderingen zoals vertraging van de gewichtstoename met ongeveer 10 %;

- ontstaan van tumoren, met name bij een hoog dosisniveau, in alleen specifieke organen van bepaalde soorten waarvan bekend is dat ze ontvankelijk zijn voor een hoge spontane tumorvorming;

- ontstaan van tumoren, op alleen de plaats van toediening, in zeer gevoelige testsystemen (bij voorbeeld i.p of s.c. toediening van bepaalde plaatselijk actieve verbindingen), wanneer het specifieke doelorgaan voor de mens niet van belang is;

- ontbreken van genotoxiciteit in kortdurende *in vivo* en *in vitro* testen;

- voorkomen van een secundair werkingsmechanisme als gevolg waarvan er een praktische grens bestaat (bij voorbeeld hormonale effecten op doelorganen of op fysiologische regelmechanismen, chronische stimulering van celproliferatie);

- voorkomen van soorten specifieke mechanismen van tumorvorming (bij voorbeeld via specifieke stofwisselingsroutes) die voor de mens niet van belang zijn.

Voor het onderscheid tussen indeling in categorie 3 en niet indelen zijn argumenten van belang op grond waarvan bezorgdheid voor de mens wordt uitgesloten :

- een stof dient in geen van de categorieën te worden ingedeeld wanneer het mechanisme van experimentele tumorvorming duidelijk is bepaald en er deugdelijk bewijs bestaat dat dit proces niet naar de mens kan worden geëxtrapoleerd;

- wanneer de enige gegevens betrekking hebben op het ontstaan van levertumoren in bepaalde gevoelige muizenstammen, en er verder geen ander aanvullend bewijs bestaat, mag de stof niet in een categorie worden ingedeeld;

- speciale aandacht moet worden geschonken aan gevallen waarin de enige beschikbare gegevens inzake tumoren betrekking hebben op het voorkomen van neoplasma's op plaatsen en in stammen waarvan bekend is dat zij daar spontaan in een hoge frequentie ontstaan.

4.2.2. Mutagene stoffen

4.2.2.1. Ten behoeve van de indeling en het kenmerken en met het oog op de thans beschikbare kennis, worden deze stoffen in drie categorieën onderverdeeld :

Categorie 1

Stoffen waarvan bekend is dat zij voor de mens mutageen zijn. Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan een stof en erfelijke genetische schade.

Categorie 2

Stoffen die dienen te worden beschouwd als mutageen voor de mens. Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan een stof kan leiden tot ontwikkeling van erfelijke genetische beschadigingen, meestal op grond van :

- geschikte langdurige dierproeven,
- andere ter zake dienende informatie.

Categorie 3

Stoffen die in verband met hun mogelijke mutagene eigenschappen reden geven tot bezorgdheid voor de mens. Er zijn aanwijzingen op grond van geschikte mutageniteitsstudies maar deze zijn onvoldoende voor indeling van de stof in categorie 2.

4.2.2.2. De volgende symbolen en waarschuwingszinnen zijn van toepassing :

Categorie 1 :

T; R46 Kan erfelijke genetische schade veroorzaken

Categorie 2

T; R46 Kan erfelijke genetische schade veroorzaken

Categorie 3

Xn; R40 Onherstelbare effecten zijn niet uitgesloten.

4.2.2.3. Opmerkingen betreffende het categoriseren van mutagene stoffen

Precisering van de begrippen :

Een mutatie is een permanente verandering in de hoeveelheid of de structuur van het genetisch materiaal in een organisme die resulteert in een verandering van de fenotypische kenmerken van het organisme. De wijzigingen kunnen betrekking hebben op een enkel gen, een groep genen of een heel chromosoom. Effecten met betrekking tot een enkel gen kunnen het gevolg zijn van effecten op afzonderlijke DNA-basen (puntmutaties) of van grote veranderingen, inclusief de deleties, binnen het gen. Effecten op hele chromosomen kunnen structurele of numerieke veranderingen omvatten. Een mutatie in de geslachtsellen in organismen die zich seksueel voortplanten kan op het nageslacht worden overgedragen. Een mutagene stof is een stof die ervoor zorgt dat mutaties zich in een hogere frequentie voordoen.

Opgemerkt moet worden dat de stoffen die als mutagene stoffen worden ingedeeld, worden ingedeeld onder uitdrukkelijke verwijzing naar erfelijke genetische schade. Het soort resultaten dat leidt tot indeling van chemicaliën in categorie 3 : "inductie van genetisch relevante gebeurtenissen in somatische cellen" wordt in het algemeen tevens gezien als een waarschuwing voor mogelijke kankerverwekkende activiteit.

Het ontwikkelen van methoden voor het testen op mutageniciteit is een lopend proces. Voor vele nieuwe testen zijn geen gestandaardiseerde protocollen en evaluatiecriteria beschikbaar. Voor de beoordeling van mutageniciteitsgegevens moeten de kwaliteit van het testresultaat en de mate van geldigheid van de testmethode in beschouwing worden genomen.

Categorie 1

Om een stof in te delen in categorie 1 is positief bewijs uit epidemiologische studies van mutaties bij de mens nodig. Voorbeelden van dergelijke stoffen zijn tot nu toe niet bekend. Onderkend wordt hoe enorm moeilijk het is om uit studies over het optreden van mutaties in menselijke populaties of van een mogelijke toename van de frequentie daarvan, betrouwbare gegevens te verkrijgen.

Categorie 2

Om een stof in te delen in categorie 2 zijn positieve onderzoeksresultaten nodig die in geslachtsellen van zoogdieren *in vivo* a) mutagene effecten of b) andere cellulaire voor mutageniciteit relevante interacties aantonen of die c) in somatische cellen van zoogdieren *in vivo* mutagene effecten aantonen, maar dan in combinatie met duidelijke aanwijzingen dat de stof of een relevante metabool de geslachtsellen bereikt.

In verband met de indeling in categorie 2 zijn op dit moment de volgende methoden geschikt :

2 a) *In vivo* onderzoeken van geslachtscelmutageniciteit :

- specifieke locus mutatie-test;
- overerfbare translokatie-test;
- dominant letaal mutatie-test.

Met deze onderzoeken wordt in feite het ontstaan van aangetast nageslacht of een defect in het ontwikkelde embryo aangetoond.

2 b) *In vivo* onderzoeken waaruit een relevante interactie tussen de verbinding en de geslachtsellen (gewoonlijk DNA) blijkt :

- onderzoek van chromosomale afwijkingen, opgespoord met behulp van cytogenetische analysetechnieken, inclusief aneuploidie als gevolg van een verkeerde segregatie van chromosomen;
- test voor zusterchromatidenuitwisseling;
- test voor DNA-synthese zonder regulatie;
- onderzoek van de (covalente) binding van de mutagene stof aan het DNA van geslachtsellen;
- onderzoek van andere soorten DNA-beschadiging.

Deze onderzoeken leveren bewijs van min of meer indirecte aard. Positieve resultaten bij deze onderzoeken dienen in de regel te worden bevestigd door positieve resultaten van *in vivo* onderzoeken van somatische-celmutageniciteit bij zoogdieren of de mens (zie onder 3, bij voorkeur de methoden van 3a).

2 c) *In vivo* onderzoeken die mutagene effecten aantonen in somatische cellen van zoogdieren (zie onder 3a), in combinatie met toxicokinetische methoden of andere methoden waarmee kan worden aangetoond dat de verbinding of een relevante metabool de geslachtscellen bereikt.

Voor 2b en 2c kunnen positieve resultaten uit "host-mediated" onderzoeken dan wel ondubbelzinnige effecten in *in vitro* onderzoeken als ondersteunend bewijs worden beschouwd.

Categorie 3

Om een stof in te delen in categorie 3 zijn positieve onderzoeksresultaten nodig die in somatische cellen van zoogdieren *in vivo* a) mutagene effecten of b) andere cellulaire voor mutageniciteit relevante interacties aantonen. Vooral het laatste soort onderzoeksresultaten dient in de regel te worden bevestigd door positieve resultaten uit *in vitro* mutageniciteitsonderzoeken.

Voor *in vivo* onderzoek van somatische cellen zijn op dit moment de volgende methoden geschikt :

3a) *In vivo* onderzoeken van somatische-celmutageniciteit :

- beenmerg micronucleustest of metafase-analyse;
- metafase-analyse van perifere lymfocyten;
- "mouse coat color spot test".

3 b) *In vivo* onderzoeken van DNA-interactie in somatische cellen :

- test voor zusterchromatidenuitwisseling in somatische cellen;
- test voor DNA-synthese zonder regulatie in somatische cellen;
- onderzoek van de (covalente) binding van de mutagene stof aan het DNA van somatische cellen;
- onderzoek van DNA-beschadiging, b.v. basische elutie, in somatische cellen.

Stoffen die alleen in één of meer *in vitro* mutageniciteitsonderzoeken positieve resultaten opleveren, dienen doorgaans niet te worden ingedeeld. Verder onderzoek ernaar door uitvoering van *in vivo* onderzoeken wordt evenwel ten sterkste aangeraden. In uitzonderlijke gevallen, bij voorbeeld wanneer een verbinding, waarvoor geen relevante *in vivo* gegevens beschikbaar zijn, in verscheidene *in vitro* onderzoeken een onmiskenbare reactie geeft en gelijkis vertoont met bekende mutagene/kankerverwekkende stoffen, kan indeling in categorie 3 worden overwogen.

4.2.3. Voor de voortplanting vergiftige stoffen

4.2.3.1. Ten behoeve van de indeling en het kenmerken en met het oog op de thans beschikbare kennis, worden deze stoffen in twee categorieën onderverdeeld :

Categorie 1

Stoffen waarvan bekend is dat zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden.

Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en verminderde vruchtbaarheid.

Stoffen waarvan bekend is dat zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken.

Er is voldoende bewijs voor een oorzakelijk verband tussen blootstelling van de mens aan de stof en latere ontwikkelingsstoornissen bij het nageslacht.

Categorie 2

Stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden.

Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot verminderde vruchtbaarheid op grond van :

- duidelijk bewijs in dierproeven voor verminderde vruchtbaarheid in afwezigheid van toxische effecten of bewijs voor verminderde vruchtbaarheid bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, hetgeen evenwel geen secundair niet-specifiek gevolg is van die andere toxische effecten;
- andere ter zake dienende informatie.

Stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken.

Er is voldoende bewijs voor een sterk vermoeden dat blootstelling van de mens aan de stof kan leiden tot ontwikkelingsstoornissen, meestal op grond van :

- duidelijke resultaten in geschikte dierproeven waarbij effecten worden waargenomen zonder dat zich bij de moederdieren uitgesproken intoxicatieverschijnselen voordoen of bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, hetgeen evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten;
- andere ter zake dienende informatie.

Categorie 3

Stoffen die in verband met hun mogelijke voor de vruchtbaarheid van de mens schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid.

Meestal op grond van :

- resultaten in geschikte dierproeven die voldoende bewijs leveren voor een sterk vermoeden voor verminderde vruchtbaarheid in afwezigheid van toxische effecten of voor verminderde vruchtbaarheid bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, hetgeen evenwel geen secundair niet-specifiek gevolg is van die andere toxische effecten, maar waarbij de aanwijzingen onvoldoende zijn voor indeling van de stof in categorie 2;
- andere ter zake dienende informatie.

Stoffen die in verband met hun mogelijke voor de ontwikkeling schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid voor de mens.

Meestal op grond van :

- resultaten in geschikte dierproeven die voldoende bewijs leveren voor een sterk vermoeden van ontwikkelingsstoornissen zonder dat zich bij de moederdieren uitgesproken intoxicatieverschijnselen voordoen of bij nagenoeg dezelfde dosisniveaus als waarop andere toxische effecten zich voordoen, hetgeen evenwel geen secundaire niet-specifieke gevolgen zijn van die andere toxische effecten, maar waarbij de aanwijzingen onvoldoende zijn voor indeling van de stof in categorie 2;
- andere ter zake dienende informatie.

4.2.3.2. De volgende symbolen en waarschuwingszinnen zijn van toepassing :

Categorie 1 :

Voor stoffen die bij de mens de vruchtbaarheid schaden :

T; R60 Kan de vruchtbaarheid schaden.

Voor stoffen die ontwikkelingsstoornissen veroorzaken :

T; R61 Kan het ongeboren kind schaden.

Categorie 2 :

Voor stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens de vruchtbaarheid schaden :

T; R60 Kan de vruchtbaarheid schaden.

Voor stoffen die dienen te worden beschouwd alsof zij bij de mens ontwikkelingsstoornissen veroorzaken :

T; R61 Kan het ongeboren kind schaden.

Categorie 3

Voor stoffen die in verband met hun mogelijke voor de vruchtbaarheid van de mens schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid :

Xn; R62 Mogelijk gevaar voor verminderde vruchtbaarheid.

Voor stoffen die in verband met hun mogelijke voor de ontwikkeling schadelijke effecten reden geven tot bezorgdheid voor de mens :

Xn; R63 Mogelijk gevaar voor beschadiging van het ongeboren kind.

4.2.3.3. *Opmerkingen betreffende het categoriseren van voor de voortplanting vergiftige stoffen*

Vergiftig zijn voor de voortplanting impliceert zowel de vermindering van de vrouwelijke en mannelijke voortplantingsfuncties of -vermogens als het doen ontstaan van niet-erfelijke schadelijke effecten bij het nageslacht. De betrokken stoffen kunnen derhalve worden gerangschikt onder twee categorieën, te weten : 1) Effecten op de vruchtbaarheid van man of vrouw en 2) Ontwikkelingsstoornissen.

1) Onder *effecten op de vruchtbaarheid van man of vrouw* worden alle nadelige effecten op libido, sexueel gedrag, de diverse aspecten van de spermatogenese of de oögenese, de hormonale activiteit of fysiologische respons verstaan die afbreuk doen aan het vermogen te bevruchten, aan de bevruchting zelf dan wel aan de ontwikkeling van de bevruchte eicel tot en met het stadium van de innesteling.

2) De term *ontwikkelingsstoornis* wordt in de breedst mogelijke zin gebruikt om elk effect dat de normale ontwikkeling, zowel voor als na de geboorte, schaadt, aan te duiden. Het gaat hierbij zowel om effecten die in het prenatale stadium voorkomen of worden geïnduceerd als die welke zich in het postnatale stadium manifesteren. Hieronder vallen voor het embryo en/of de foetus toxische effecten zoals verminderd lichaamsgewicht, vertraagde groei en ontwikkeling, orgaan toxiciteit, sterfte, miskraam, structurele defecten (teratogene effecten), functionele defecten, peri-postnatale defecten en een verstoorde postnatale mentale of fysieke ontwikkeling tot en met het stadium van de normale puberteitsontwikkeling.

De indeling van chemische stoffen als vergiftig voor de voortplanting is bedoeld voor chemische stoffen die de intrinsieke of specifieke eigenschap hebben dergelijke toxische effecten teweeg te brengen. Dergelijke stoffen moeten niet als zodanig worden ingedeeld als die effecten uitsluitend het niet-specifieke secundaire gevolg zijn van andere toxische effecten. De stoffen die de meeste reden tot bezorgdheid geven zijn die welke vergiftig voor de voortplanting zijn bij blootstellingsniveaus waarbij zich geen andere toxische effecten voordoen.

De indeling van een stof in categorie I in verband met schadelijke effecten op de vruchtbaarheid en/of de ontwikkeling geschiedt op basis van epidemiologische gegevens; die in categorie 2 en 3 hoofdzakelijk op basis van dierproeven. Gegevens uit *in vitro* onderzoeken of studies van vogeleieren worden beschouwd als "ondersteunend bewijs" en zullen bij het niet voorhanden zijn van *in vivo* gegevens er slechts bij uitzondering toe leiden dat een stof wordt ingedeeld.

Net als bij de meeste andere soorten toxische effecten zullen voor de voortplanting vergiftige stoffen naar verwachting een drempelwaarde hebben waaronder geen nadelige effecten kunnen worden aangetoond. Zelfs als in dierproeven duidelijke effecten worden waargenomen kan de betekenis voor de mens twijfelachtig zijn omdat de effecten zich bij voorbeeld uitsluitend bij hoge doses voordoen of omdat er duidelijke toxicokinetische verschillen bestaan of de wijze van toediening niet geschikt is. Om deze of vergelijkbare redenen kan indeling in categorie 3 of zelfs niet indelen gerechtvaardigd zijn.

In bijlage V van dit besluit wordt een limiettest beschreven voor stoffen met een geringe toxiciteit. Als uit het oraal toedienen van een dosis van ten minste 1000 mg/kg niet blijkt dat de stof vergiftig is voor de voortplanting kan testen bij andere dosisniveaus als onnodig worden beschouwd. Als er gegevens voorhanden zijn van onderzoeken die zijn uitgevoerd met hogere doses dan de voornoemde limiet, moeten die gegevens worden geëvalueerd samen met andere relevante gegevens. Normaal is dat, als effecten zich alleen bij doses hoger dan de limiet voordoen dit niet noodzakelijkerwijs hoeft te betekenen dat een stof als vergiftig voor de voortplanting wordt ingedeeld.

EFFECTEN OP DE VRUCHTBAARHEID

Om een stof vanwege schadelijke effecten op de vruchtbaarheid in te delen in categorie 2 moet doorgaans positief bewijs bij één diersoort als mede ondersteunend bewijs over hoe of waar de stof aangrijpt voorhanden zijn dan wel een chemische relatie met andere bekende onvruchtbaarheid-inducerende stoffen bestaan of andere gegevens met betrekking tot de mens beschikbaar zijn waaruit blijkt dat het aannemelijk is dat er zich bij de mens effecten zullen voordoen. Daar waar slechts testresultaten bij één diersoort en geen ander relevant ondersteunend bewijs voorhanden zijn, kan indeling in categorie 3 passend zijn.

Omdat verminderde vruchtbaarheid zich kan voordoen als een niet-specifiek neveneffect bij ernstige algehele intoxicatie of in een toestand van ernstige verzwakking, mag een stof pas in categorie 2 worden ingedeeld als is aangetoond dat de stof een zekere mate van specifieke toxiciteit voor het voortplantingssysteem heeft. Als uit de resultaten van dierproeven blijkt dat verminderde vruchtbaarheid het gevolg is van het onvermogen te paren moet men voor indeling in categorie 2 doorgaans over informatie met betrekking tot het werkingsmechanisme beschikken ten einde na te kunnen gaan of het aannemelijk is dat nadelige effecten, zoals veranderingen in het patroon van hormoonafgifte, zich ook bij de mens manifesteren.

ONTWIKKELINGSSTOORNISSEN

Voor indeling in categorie 2 moeten in degelijk uitgevoerde onderzoeken bij één of meer diersoorten nadelige effecten duidelijk zijn aangetoond. Omdat nadelige effecten tijdens de zwangerschap of daarna een secundair gevolg kunnen zijn van intoxicatie van het moederdier, verminderde opname van voedsel en water, het optreden van stress bij het moederdier, gebrek aan moederlijke zorg, specifieke tekortkomingen in het dieet, slechte huisvesting, bijkomende infecties, enz. is het van belang dat de effecten zijn waargenomen in degelijk uitgevoerde onderzoeken en bij doses die geen verband houden met een duidelijke intoxicatie van het moederdier. Ook de wijze van toediening is van belang. Zo geldt met name dat het intraperitonaal injecteren van irritante stoffen de baarmoeder en de inhoud daarvan kan beschadigen; de resultaten van dergelijke onderzoeken moeten derhalve met omzichtigheid worden geïnterpreteerd en vormen op zich zelf doorgaans geen grondslag voor indeling.

De indeling van een stof in categorie 3 geschiedt op basis van dezelfde criteria als voor categorie 2; indeling in categorie 3 kan worden overwogen in die gevallen wanneer de proefopzet hiaten vertoont die de conclusies minder overtuigend maken of wanneer de mogelijkheid niet kan worden uitgesloten dat de effecten het gevolg zijn van niet-specifieke invloeden, zoals algehele intoxicatie.

In het algemeen worden stoffen ingedeeld in categorie 3 of niet ingedeeld op een *ad hoc* basis als de enige effecten bestaan in kleine veranderingen in het optreden van spontane defecten, kleine veranderingen in de verhouding van nature voorkomende varianten zoals die worden waargenomen bij skeletonderzoeken of kleine verschillen in postnatale-ontwikkelingsstudies.

Effecten tijdens de lactatieperiode

Stoffen die als vergiftig voor de voortplanting zijn ingedeeld maar ook reden tot bezorgdheid geven in verband met hun effecten op de melkafscheiding moeten tevens met R64 worden gekenmerkt (zie criteria in paragraaf 3.2.8).

Met het oog op de indeling zij opgemerkt dat toxische effecten op het nageslacht als gevolg van *uitsluitend* blootstelling via de moedermelk of toxische effecten als gevolg van *directe* blootstelling van kinderen niet als "voor de voortplanting vergiftig" worden beschouwd, tenzij dergelijke effecten leiden tot een gebrekkige ontwikkeling van het nageslacht.

Stoffen die niet als « voor de voortplanting vergiftig » zijn ingedeeld maar reden geven tot bezorgdheid als gevolg van hun toxiciteit wanneer ze tijdens de lactatie periode worden doorgegeven aan de baby, moeten met R64 worden gekenmerkt (zie criteria in paragraaf 3.2.8). Deze R-zin kan ook geschikt zijn voor stoffen die een nadelige invloed hebben op de kwaliteit of de kwantiteit van de melk.

R64 wordt doorgaans toegekend op basis van :

- a) toxicokinetische onderzoeksresultaten op grond waarvan aannemelijk wordt gemaakt dat de stof in potentieel toxische concentraties in de moedermelk voorkomt, en/of
- b) de resultaten van één of twee generatiestudies bij dieren waaruit blijkt dat er sprake is van schadelijke effecten bij het nageslacht als gevolg van de melkvoeding, en/of
- c) aanwijzingen bij de mens waaruit blijkt dat baby's tijdens de lactatieperiode gevaar lopen.

Stoffen waarvan bekend is dat ze in het lichaam accumuleren en vervolgens tijdens de lactatieperiode in de melk terecht kunnen komen, worden gekenmerkt met R33 en R64.

4.2.4. Procedure voor de indeling van preparaten in verband met bepaalde bijzondere effecten op de gezondheid

Indien een preparaat één of meer stoffen bevat die op basis van bovenstaande criteria zijn ingedeeld, moet het worden ingedeeld overeenkomstig de criteria van artikel 5, § 5, onder j) tot en met q) van het K.B. van 11 januari 1993 (de concentratiegrenzen worden vermeld in hetzij bijlage I van dit besluit, hetzij in bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993, wanneer de desbetreffende stof(fen) niet in bijlage I voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder de bijbehorende concentratiegrenzen).

5. INDELING OP BASIS VAN MILIEU-EFFECTEN

5.1. Inleiding

Met het indelen van voor het milieu gevaarlijke stoffen wordt in eerste instantie beoogd de gebruiker te wijzen op de gevaren van deze stoffen voor ecosystemen. Hoewel de huidige criteria grotendeels betrekking hebben op aquatische ecosystemen ziet men wel in dat bepaalde stoffen eveneens of uitsluitend ook andere ecosystemen kunnen aantasten waarvan de componenten kunnen variëren van microflora en microfauna in de bodem tot primaten.

Onderstaande criteria vloeien rechtstreeks voort uit de testmethoden van bijlage V voor zover zij daarin worden vermeld. De voor het in bijlage VII vermelde "basisdossier" benodigde testmethoden zijn beperkt en de informatie die eraan wordt ontleend kan voor een passende indeling onvoldoende zijn. Voor het indelen kunnen aanvullende gegevens nodig zijn ontleend aan niveau 1 (bijlage VIII) of andere gelijkwaardige studies. Bovendien kunnen ingedeelde stoffen in het licht van nieuwe gegevens moeten worden herzien.

Ten behoeve van de indeling en het kenmerken en met het oog op de thans beschikbare kennis worden dergelijke stoffen in twee categorieën onderverdeeld op basis van hun acute en/of lange-termijn-effecten in aquatische systemen of hun acute en/of lange-termijn-effecten in niet-aquatische systemen.

5.2. Criteria voor de indeling, gevaarsaanduidingen en keuze van waarschuwingsszinnen

5.2.1. Aquatisch milieu

5.2.1.1. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu en gekenmerkt met het symbool "N" en de passende gevaarsaanduiding en krijgen waarschuwingsszinnen toegekend volgens de onderstaande criteria :

R50 : Zeer giftig voor in het water levende organismen

en

R53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC ₅₀ (voor vissen)	≤ 1 mg/l
	of	48 h EC ₅₀ (voor Daphnia)
	of	72 h IC ₅₀ (voor algen)

en de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar of de log Pow (log verdelingscoëfficiënt octanol/water) ≥ 3,0 (tenzij de experimenteel bepaalde BCF ≤ 100).

R50 : Zeer vergiftig voor in het water levende organismen

Acute toxiciteit :	96 h LC ₅₀ (voor vissen)	≤ 1 mg/l
	of	48 h EC ₅₀ (voor Daphnia)
	of	72 h IC ₅₀ (voor algen)

R51 : Vergiftig voor in het water levende organismen

en

R 53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC ₅₀ (voor vissen)	1 mg/l < LC ₅₀ ≤ 10 mg/l
	of	48 h EC ₅₀ (voor Daphnia)
	of	72 h IC ₅₀ (voor algen)

en de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar of de log Pow ≥ 3,0 (tenzij de experimenteel bepaalde BCF ≤ 100).

5.2.1.2. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu overeenkomstig de onderstaande criteria. Waarschuwingsszinnen worden eveneens toegekend volgens de volgende criteria :

R52 : Schadelijk voor in het water levende organismen

en

R53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Acute toxiciteit :	96 h LC ₅₀ (voor vissen)	10 mg/l < LC ₅₀ ≤ 100 mg/l
	of	48 h EC ₅₀ (voor Daphnia)
	of	72 h IC ₅₀ (voor algen)

en de stof is niet gemakkelijk afbreekbaar.

Dit criterium is van toepassing tenzij er voldoende aanvullend wetenschappelijk bewijs inzake degradatie en/of toxiciteit bestaat om afdoende zekerheid te bieden dat noch de stof, noch zijn degradatieproducten een potentieel lange-termijn en/of vertraagd gevaar voor het aquatisch milieu vormen. Dergelijk aanvullend wetenschappelijk bewijs dient normaliter te zijn gebaseerd op de op niveau 1 (bijlage VIII) vereiste studies dan wel gelijkwaardige studies en kan het volgende omvatten :

i) een bewezen vermogen tot snelle degradatie in het aquatisch milieu;

ii) het ontbreken van chronische toxiciteitseffecten bij een concentratie van 1,0 mg/l, b.v. indien bij een concentratie van meer dan 1,0 mg/l in een verlengde toxiciteitsstudie met vis of Daphnia geen effecten worden waargenomen.

R52 : Schadelijk voor in het water levende organismen

Stoffen die niet onder bovenstaande criteria in dit hoofdstuk vallen, maar die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun toxiciteit evenwel een gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van aquatische ecosystemen.

R53 : Kan in het aquatisch milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken

Stoffen die niet onder bovenstaande criteria in dit hoofdstuk vallen, maar die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun persistentie, accumulatievermogen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu evenwel een lange-termijn en/of vertraagd gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van aquatische ecosystemen. Slecht in water oplosbare stoffen, dit wil zeggen stoffen met een oplosbaarheid van minder dan 1 mg/l vallen onder dit criterium als :

a) ze niet gemakkelijk afbreekbaar zijn en

b) log Pow ≥ 3,0 (tenzij de experimenteel bepaalde BCF ≤ 100).

Dit criterium is van toepassing tenzij er voldoende aanvullend wetenschappelijk bewijs inzake degradatie en/of toxiciteit bestaat om afdoende zekerheid te bieden dat noch de stof noch zijn degradatieproducten een potentieel lange-termijn en/of vertraagd gevaar voor het aquatisch milieu vormen.

Dergelijk aanvullend wetenschappelijk bewijs dient normaliter te zijn gebaseerd op de op niveau 1 (bijlage VIII) vereiste studies dan wel gelijkwaardige studies en kan het volgende omvatten :

- i) een bewezen vermogen tot snelle degradatie in het aquatisch milieu;
- ii) het ontbreken van chronische toxiciteitseffecten bij de oplosbaarheidsgrens, bij voorbeeld indien bij een concentratie hoger dan de oplosbaarheidsgrens in een verlengde toxiciteitsstudie met vis of Daphnia geen effecten worden waargenomen.

5.2.1.3. *Opmerkingen betreffende de bepaling van IC50 voor algen en de gemakkelijke afbreekbaarheid :*

— waar in geval van sterk gekleurde stoffen kan worden aangetoond dat algengroei uitsluitend als gevolg van een reductie in lichtintensiteit wordt geremd, mag de 72h IC50 voor algen niet als basis voor indeling worden gebruikt;

— stoffen worden als gemakkelijk afbreekbaar beschouwd wanneer de volgende criteria gelden :

A. Wanneer in biodegradatiestudies van 28 dagen de volgende degradatieniveaus worden bereikt :

— in op opgeloste organische koolstof gebaseerde testen : 70 %,

— in op zuurstofdepletie of koolstofdioxide-ontwikkeling gebaseerde testen : 60 % van de theoretische maxima.

Deze biodegradatieniveaus moeten worden bereikt binnen 10 dagen na het begin van de degradatie, hetgeen wordt gesteld als het moment waarop 10 % van de stof is afgebroken;

of

B. in die gevallen waarin alleen gegevens over COD en BOD5 beschikbaar zijn, indien het BOD5/COD quotiënt groter of gelijk is aan 0,5;

of

C. als ander overtuigend wetenschappelijk bewijs beschikbaar is om aan te tonen dat de stof in het aquatisch milieu kan worden afgebroken (biotisch en/of abiotisch) tot > 70/ % binnen een periode van 28 dagen.

5.2.2. Niet-aquatisch milieu

5.2.2.1. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu en gekenmerkt met het symbool "N" en de passende gevaarsaanduiding en krijgen waarschuwingzinnen toegekend volgens de onderstaande criteria :

R54 Vergiftig voor planten. R55 Vergiftig voor dieren. R56 Vergiftig voor bodemorganismen. R57 Vergiftig voor bijen. R58 Kan in het milieu op lange termijn schadelijke effecten veroorzaken.

Andere dan onder 5.2.1 vallende stoffen die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun toxiciteit, persistentie, accumulatievermogen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu een direct of lange-termijn en/of vertraagd gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van natuurlijke ecosystemen. Gedetailleerde criteria zullen later worden uitgewerkt.

R59 Gevaarlijk voor de ozonlaag

Stoffen die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun eigenschappen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu een gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van de ozonlaag. Hieronder vallen de stoffen die zijn opgenomen in de groepen I, II, III, IV en V van bijlage I van Verordening (EEG) nr. 594/91 inzake stoffen die de ozonlaag aantasten (PB nr. L 67 van 14 maart 1991, blz. 1).

5.2.2.2. Stoffen worden ingedeeld als gevaarlijk voor het milieu volgens hierna vermelde criteria. Waarschuwingzinnen zullen eveneens volgens onderstaande criteria worden toegekend :

R59 : Gevaarlijk voor de ozonlaag.

Stoffen die niet onder hierbovenvermelde criteria in 5.2.2.1 vallen die op basis van het beschikbare bewijs met betrekking tot hun eigenschappen en hun voorspelde of waargenomen gedrag en uiteindelijke plaats en vorm in het milieu een gevaar kunnen vormen voor de structuur en/of werking van de ozonlaag. Hieronder vallen de stoffen die zijn opgenomen in de groep VI van bijlage I van Verordening (EEG) nr. 594/91 inzake stoffen die de ozonlaag aantasten (PB nr. L 67 van 14 maart 1991, blz. 1).

6. KEUZE VAN VEILIGHEIDSAANBEVELINGEN

6.1. Inleiding

Veiligheidsaanbevelingen (S-zinnen) worden toegekend aan gevaarlijke stoffen en preparaten overeenkomstig de volgende algemene criteria. Bovendien zijn voor bepaalde preparaten de veiligheidsaanbevelingen opgenomen in bijlage II van het K.B. van 11 januari 1993 verplicht. Overal waar in de S-zinnen wordt gerefereerd aan de "fabrikant" wordt mede de verantwoordelijke persoon bedoeld, die een stof of preparaat op de markt brengt.

6.2. Veiligheidsaanbevelingen voor stoffen en preparaten

S1 *Achter slot bewaren*

— Toepassing :

— zeer giftige, vergiftige en bijtende stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor de bovengenoemde stoffen en preparaten indien ze aan het grote publiek worden verkocht.

S2 *Buiten bereik van kinderen bewaren*

— Toepassing :

— alle gevaarlijke stoffen en preparaten.

— Gebruiskriteria :

— verplicht voor alle gevaarlijke stoffen en preparaten die aan het grote publiek worden verkocht, behalve voor deze die enkel ingedeeld zijn als gevaarlijk voor het milieu.

S3 Op een koele plaats bewaren

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- andere gevaarlijke stoffen en preparaten met een kookpunt gelijk aan of lager dan 40 °C.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor organische peroxiden, tenzij S47 wordt gebruikt;
- aanbevolen voor andere gevaarlijke stoffen en preparaten met een kookpunt gelijk aan of lager dan 40 °C.

S4 Verwijderd van woonruimten opbergen

- Toepassing :
- zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot zeer vergiftige en vergiftige stoffen en preparaten als mogelijke aanvulling op S13; bij voorbeeld wanneer het inademen gevaar oplevert en de stof of het preparaat buiten woonruimten moet worden bewaard. De aanbeveling houdt niet in dat de stof of het preparaat niet op de juiste wijze in woonruimten mag worden gebruikt.

S5 Onder... houden (geschikte vloeistof, aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- gevaarlijke stoffen en preparaten die spontaan kunnen ontvlammen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals natrium, kalium of witte fosfor.

S6 Onder... houden (inert gas, aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- gevaarlijke stoffen en preparaten die in een inerte atmosfeer moeten worden bewaard.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals bepaalde organometaalverbindingen.

S7 In goed gesloten verpakking bewaren

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige, schadelijke of zeer licht ontvlambare gassen kunnen ontwikkelen;
- stoffen en preparaten die in contact met vocht zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- licht ontvlambare vaste stoffen.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor de overige bovengenoemde toepassingen.

S8 Verpakking droog houden

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die heftig met water kunnen reageren;
- stoffen en preparaten die in contact met water zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- stoffen en preparaten die in contact met water zeer vergiftige of vergiftige gassen ontwikkelen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bovengenoemde toepassingen wanneer de waarschuwingen R14, R15 in het bijzonder en R29 moeten worden benadrukt.

S9 Op een goed geventileerde plaats bewaren

- Toepassing :
- vluchtige stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige of schadelijke dampen kunnen ontwikkelen;
- zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen en zeer licht ontvlambare gassen.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor vluchtige stoffen en preparaten die zeer vergiftige, vergiftige of schadelijke dampen kunnen ontwikkelen;
- aanbevolen voor zeer licht ontvlambare en licht ontvlambare vloeistoffen of zeer licht ontvlambare gassen.

S12 De verpakking niet hermetisch sluiten

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die door het ontwikkelen van gassen of dampen de verpakking kunnen doorbreken.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bovengenoemde bijzondere gevallen.

S13 Verwijderd houden van eet- en drinkwaren en van diervoeder

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige en schadelijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer die stoffen en preparaten waarschijnlijk ook zijn bestemd voor gebruik door het grote publiek.

S14 Verwijderd houden van... (stoffen waarmee contact vermeden dient te worden, aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- organische peroxiden.
- Gebruiskriteria :
- verplicht voor en doorgaans beperkt tot organische peroxiden. Bij uitzondering echter ook in andere gevallen bruikbaar wanneer contact met bepaalde andere stoffen een bijzonder gevaar oplevert.

S15 Verwijderd houden van warmte

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die onder invloed van warmte kunnen ontlede of spontaan reageren.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals monomeren, maar niet wanneer de waarschuwingssinnen R2, R3 en/of R5 al zijn toegekend.

S16 Verwijderd houden van ontstekingsbronnen— niet roken

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen en zeer licht ontvlambare gassen.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor de bovengenoemde stoffen en preparaten maar niet wanneer de waarschuwingsszin R2, R3 of R5 al is toegekend.

S17 Verwijderd houden van brandbare stoffen

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die tesamen met brandbare stoffen ontplofbare of spontaan ontvlambare mengsels kunnen vormen.
- Gebruiskriteria :
- beschikbaar voor gebruik in bijzondere gevallen, bij voorbeeld om R8 en R9 te benadrukken.

S18 Verpakking voorzichtig behandelen en openen

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die in de verpakking een overdruk kunnen ontwikkelen;
- stoffen en preparaten die ontplofbare peroxiden kunnen vormen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot de bovengenoemde gevallen wanneer er gevaar bestaat voor de ogen en/of wanneer de stoffen en preparaten waarschijnlijk ook bestemd zijn voor gebruik door het grote publiek.

S20 Niet eten of drinken tijdens gebruik

- Toepassing :
- zeer vergiftige, vergiftige en bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bij voorbeeld arseen en arseenverbindingen, fluoracetaten), vooral wanneer deze stoffen en preparaten waarschijnlijk ook bestemd zijn voor gebruik door het grote publiek.

S21 Niet roken tijdens gebruik

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die bij verbranding giftige produkten vormen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals gehalogeneerde verbindingen.

S22 Stof niet inademen

- Toepassing :
- alle gevaarlijke vaste stoffen en preparaten gevaarlijk voor de gezondheid.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor de bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan R42 is toegekend;
- aanbevolen voor de bovengenoemde stoffen en preparaten die in de vorm van inhaleerbaar stof worden verstrekt en waarvoor de gezondheidsrisico's bij inademing onbekend zijn.

S23 Gas/rook/damp/spuitnevel niet inademen (toepasselijke term(en) aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- alle gevaarlijke vloeibare of gasvormige stoffen en preparaten gevaarlijk voor de gezondheid.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor de bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan R42 is toegekend;
- *verplicht* voor stoffen en preparaten bedoeld om te spuiten. In aanvulling hierop moet S38 of S51 worden toegekend;
- aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op inademingsgevaar dat niet in de toegekende waarschuwingszinnen is vermeld.

S24 Aanraking met de huid vermijden

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten gevaarlijk voor de gezondheid.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor de stoffen en preparaten waaraan R43 is toegekend tenzij S36 ook al is toegekend;
- aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op gevaar van huidcontact dat niet in de toegekende waarschuwingszinnen is vermeld. Ook bruikbaar om dergelijke waarschuwingszinnen te benadrukken.

S25 Aanraking met de ogen vermijden

- Toepassing :
- bijtende en irriterende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen, wanneer het absoluut nodig wordt geacht om het gevaar voor de ogen, dat met R34, R35, R36 of R41 wordt aangeduid, te benadrukken. Belangrijk indien deze stoffen en preparaten waarschijnlijk ook worden gebruikt door het grote publiek dat niet altijd over oog- of gezichtsbescherming beschikt.

S26 Bij aanraking met de ogen onmiddellijk met overvloedig water afspoelen en deskundig medisch advies inwinnen

- Toepassing :
- bijtende en irriterende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor bijtende stoffen en preparaten en voor stoffen en preparaten waaraan R41 is toegekend;
- aanbevolen voor irriterende stoffen waaraan R36 is toegekend.

S27 Verontreinigde kleding onmiddellijk uittrekken

- Toepassing :
- zeer giftige, vergiftige en corrosieve stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor zeer giftige en vergiftige stoffen en preparaten die gemakkelijk door de huid worden geabsorbeerd en voor bijtende stoffen en preparaten. Deze veiligheidsaanbeveling evenwel niet gebruiken indien S36 is toegekend.

S28 Na aanraking met de huid onmiddellijk wassen met veel... (aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- zeer giftige, vergiftige of bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor zeer giftige stoffen en preparaten;
- aanbevolen voor de overige bovengenoemde stoffen en preparaten, vooral wanneer water niet de meest geschikte vloeistof is om mee te spoelen.

S29 Afval niet in de gootsteen werpen

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare of licht ontvlambare vloeistoffen die niet mengbaar zijn met water.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor de bovengenoemde stoffen en preparaten die ook bestemd zijn voor gebruik door het grote publiek.

S30 Nooit water op deze stof gieten

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die heftig met water reageren.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bij voorbeeld zwavelzuur) en bruikbaar om R14 te benadrukken of te vervangen, indien dit de duidelijkheid op het etiket vergroot.

S33 Maatregelen treffen tegen ontladingen van statische elektriciteit

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare en licht ontvlambare stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor industrieel gebruikte stoffen en preparaten die geen vocht absorberen. Eigenlijk nooit gebruikt voor stoffen en preparaten die in de handel worden gebracht voor gebruik door het grote publiek.

S35 Deze stof en de verpakking op veilige wijze afvoeren

- Toepassing :
- ontplofbare stoffen en preparaten;
- zeer vergiftige en giftige stoffen en preparaten;
- stoffen die gevaarlijk zijn voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor andere ontplofbare stoffen en preparaten dan organische peroxiden;
- aanbevolen voor zeer giftige en giftige stoffen en preparaten, vooral als deze ook door het grote publiek worden gebruikt;
- aanbevolen voor milieugevaarlijke stoffen waarop S56 niet van toepassing is als die ook door het grote publiek worden gebruikt.

S36 Draag geschikte beschermende kleding

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- zeer vergiftige, giftige en schadelijke stoffen en preparaten;
- bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor zeer vergiftige en bijtende stoffen en preparaten;
- *verplicht* voor stoffen en preparaten waaraan R21 of R24 is toegekend.
- *verplicht* voor de kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige stoffen van categorie 3, tenzij de effecten uitsluitend optreden na inademing van de stof of het preparaat;
- *verplicht* voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor vergiftige stoffen en preparaten indien de LD50-waarde dermaal, onbekend is maar de stof of het preparaat via huidcontact waarschijnlijk toxisch werkzaam is;
- aanbevolen voor stoffen en preparaten die in de industrie worden gebruikt en die de gezondheid schaden bij langdurige blootstelling.

S37 Draag geschikte handschoenen

- Toepassing :
- zeer vergiftige, giftige, schadelijke of bijtende stoffen en preparaten;
- organische peroxiden;
- stoffen en preparaten die de huid irriteren.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor zeer vergiftige en bijtende stoffen en preparaten;
- *verplicht* voor stoffen en preparaten waaraan R21, R24 of R43 is toegekend;
- *verplicht* voor de kankerverwekkende, mutagene en voor de voortplanting vergiftige stoffen van categorie 3, tenzij de effecten uitsluitend optreden na inademing van de stof of het preparaat;
- *verplicht* voor organische peroxiden;
- aanbevolen voor vergiftige stoffen en preparaten indien de LD50-waarde dermaal, onbekend is maar de stof of het preparaat via huidcontact waarschijnlijk toxisch werkzaam is;
- aanbevolen voor stoffen en preparaten die de huid irriteren als gevolg van hun ontvettende eigenschappen.

S38 *Bij ontoereikende ventilatie een geschikte adembescherming dragen*

- Toepassing :
- zeer vergiftige of giftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen waarin zeer vergiftige of giftige stoffen en preparaten in de industrie of in de landbouw worden gebruikt.

S39 *Een bescherming voor de ogen/voor het gezicht dragen*

- Toepassing :
- organische peroxiden;
- bijtende stoffen en preparaten, met inbegrip van irriterende stoffen die gevaar voor ernstig oogletsel opleveren;
- zeer vergiftige of giftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor stoffen en preparaten waaraan R34, R35 of R41 is toegekend;
- *verplicht* voor organische peroxiden;
- aanbevolen wanneer de aandacht van de gebruiker moet worden gevestigd op oogletselgevaar dat niet in de toegekende waarschuwingzinnen is vermeld;
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen voor zeer vergiftige en giftige stoffen en preparaten die kans op spatten geven en die waarschijnlijk gemakkelijk door de huid worden geabsorbeerd.

S40 *Voor het reinigen van de vloer en alle voorwerpen verontreinigd met dit materiaal... gebruiken (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- alle gevaarlijke stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot de gevaarlijke stoffen en preparaten waarvoor water niet het meest geschikte reinigingsmiddel is (bij voorbeeld wanneer absorptie door poedervormig materiaal of oplossen met een oplosmiddel nodig is) en waarbij met het oog op de gezondheid en/of de veiligheid een waarschuwing op het etiket van belang is.

S41 *In geval van brand en/of ontploffing inademen van rook vermijden*

- Toepassing :
- gevaarlijke stoffen en preparaten die bij verbranding zeer vergiftige of giftige gassen ontwikkelen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen.

S42 *Tijdens de ontsmetting/bespuiting een geschikte adembescherming dragen (juiste term(en) aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die voor een dergelijk gebruik bedoeld zijn, maar die, indien geen goede voorzorgsmaatregelen worden getroffen, een gevaar voor de gezondheid en de veiligheid vormen.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen.

S43 *In geval van brand... gebruiken (blusmiddelen aan te duiden door de fabrikant. Indien water het risico vergroot, toevoegen : "nooit water gebruiken")*

- Toepassing :
- zeer licht ontvlambare, licht ontvlambare en ontvlambare stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor stoffen en preparaten die in contact met water of vochtige lucht zeer licht ontvlambare gassen ontwikkelen;
- aanbevolen voor zeer licht ontvlambare, licht ontvlambare en ontvlambare stoffen en preparaten, in het bijzonder wanneer deze niet mengbaar zijn met water.

S45 *Bij een ongeval of indien men zich onwel voelt, onmiddellijk een arts raadplegen (indien mogelijk hem dit etiket tonen)*

- Toepassing :
- zeer vergiftige stoffen en preparaten;
- vergiftige en bijtende stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor de bovenbedoelde stoffen en preparaten.

S46 *In geval van inslikken, onmiddellijk een arts raadplegen en verpakking of etiket tonen.*

- Toepassing :
- alle andere gevaarlijke stoffen en preparaten dan die welke zeer vergiftig, vergiftig, bijtend of gevaarlijk voor het milieu zijn.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor alle bovenbedoelde gevaarlijke stoffen en preparaten die waarschijnlijk ook door het grote publiek worden gebruikt, tenzij inslikken, in het bijzonder voor kinderen, geen enkel gevaar oplevert.

S47 *Bewaren bij een temperatuur beneden... °C (aan te geven door de fabrikant)*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die bij een bepaalde temperatuur instabiel worden.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen (bij voorbeeld bepaalde organische peroxiden).

S48 *Inhoud vochtig houden met...* (middel aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die bij opdrogen zeer gevoelig kunnen worden voor vonken, wrijving of stoten.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot bijzondere gevallen zoals nitrocellulosen.

S49 *Uitsluitend in de oorspronkelijke verpakking bewaren*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die gevoelig zijn voor katalytische ontleding.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot stoffen en preparaten die gevoelig zijn voor katalytische ontleding (zoals bij voorbeeld bepaalde organische peroxiden).

S50 *Niet vermengen met...* (aan te geven door de fabrikant)

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die met de aangegeven stof kunnen reageren onder vorming van zeer vergiftige of vergiftige gassen;
- organische peroxiden.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor bovengenoemde stoffen en preparaten die waarschijnlijk door het grote publiek worden gebruikt, voor het geval dit de voorkeur verdient boven R31 of R32;
- *verplicht* voor bepaalde peroxiden die met versnellers of promotoren een heftige reactie kunnen geven.

S51 *Uitsluitend op goed geventileerde plaatsen gebruiken*

- Toepassing :
- stoffen en preparaten die, al of niet bedoeld, damp, rook, nevel, stof en dergelijke kunnen vormen, met gevaar voor de ademhaling of met gevaar voor brand of ontploffing.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer het gebruik van S38 minder geschikt is. Vooral belangrijk wanneer dergelijke stoffen en preparaten waarschijnlijk ook door het grote publiek worden gebruikt.

S52 *Niet voor gebruik op grote oppervlakken in woon- en verblijfruimten*

- Toepassing :
- vluchtige zeer vergiftige, vergiftige en schadelijke stoffen, en preparaten die deze stoffen bevatten.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen wanneer langdurige blootstelling hieraan vanwege het vrijkomen in woon- en verblijfruimten door verdamping uit de behandelde oppervlakken waarschijnlijk gezondheidsschade veroorzaakt.

S53 *Blootstelling vermijden — vóór gebruik speciale aanwijzingen raadplegen*

- Toepassing :
- kankerverwekkende, mutagene en/of voor de voortplanting vergiftige stoffen en preparaten.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor bovengenoemde stoffen en preparaten waaraan ten minste één van de volgende R-zinnen werd toegekend : R45, R46, R49, R60 of R61.

S56 *Deze stof en de verpakking naar inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen*

- Toepassing :
- stoffen gevaarlijk voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor stoffen waaraan het symbool "N" is toegekend en die waarschijnlijk door het grote publiek gebruikt worden.

S57 Neem passende maatregelen om verspreiding in het milieu te voorkomen

- Toepassing :
- stoffen waaraan het symbool « N » is toegekend.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans beperkt tot stoffen die niet bestemd zijn voor gebruik door het grote publiek.

S59 Raadpleeg fabrikant/leverancier voor informatie over terugwinning/recycling

- Toepassing :
- stoffen die gevaarlijk zijn voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor stoffen die gevaarlijk zijn voor de ozonlaag;
- aanbevolen voor andere stoffen waaraan het symbool "N" is toegekend en waarvan terugwinning/recycling wordt aanbevolen.

S60 Deze stof en/of de verpakking als gevaarlijk afval afvoeren

- Toepassing :
- stoffen gevaarlijk voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- aanbevolen voor stoffen waaraan het symbool "N" is toegekend en die waarschijnlijk niet bestemd zijn voor gebruik door het grote publiek.

S61 Voorkom lozing in het milieu. Vraag om speciale instructies/veiligheidsgegevenskaart

- Toepassing :
- stoffen die gevaarlijk zijn voor het milieu.
- Gebruiskriteria :
- doorgaans gebruikt voor stoffen waaraan het symbool "N" is toegekend;
- aanbevolen voor alle andere milieugevaarlijke stoffen dan bovenstaande.

S62 Bij inslikken niet het braken opwekken; direct een arts raadplegen en de verpakking of het etiket tonen

- Toepassing :
- stoffen en preparaten in vloeibare vorm met een door middel van rotatie-viscometrie overeenkomstig ISO-norm 3219 of een vergelijkbare methode bepaalde kinematische viscositeit van minder dan $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ bij $40 \text{ }^\circ\text{C}$ die *tevens* alifatische, alicyclische en/of aromatische koolwaterstoffen bevatten in een totale concentratie groter dan of gelijk aan 10 %;
- niet van toepassing op stoffen en preparaten die in spuitbussen op de markt worden gebracht.
- Gebruiskriteria :
- *verplicht* voor de bovengenoemde stoffen en preparaten indien ze aan het grote publiek worden verkocht of waarschijnlijk door het grote publiek worden gebruikt;
- aanbevolen voor de bovengenoemde stoffen en preparaten wanneer die in de industrie worden gebruikt.

7. ETIKETERING

7.1. Wanneer een stof of preparaat is ingedeeld, wordt op basis van de eisen van artikel 8, § 1 van dit besluit en artikel 9 van het K.B. van 11 januari 1993 voor respectievelijk stoffen en preparaten het geschikte etiket vastgesteld. In deze paragraaf, die met name dient als leidraad bij de keuze van de geschikte waarschuwingszinnen en veiligheidsaanbevelingen, wordt verklaard hoe de vermeldingen op het etiket worden vastgesteld.

Het etiket bevat de volgende informatie :

- a) de benaming of benamingen van de stof(fen) die op het etiket zullen voorkomen;
- b) de naam, het adres en het telefoonnummer van de fabrikant/importeur;
- c) de gevaarsymbolen en -aanduidingen;
- d) de standaardvermeldingen waarin de bijzondere risico's tot uitdrukking komen (R-zinnen);
- e) de standaardvermeldingen waarin de veiligheidsaanbevelingen tot uitdrukking komen (S-zinnen);
- f) voor stoffen, het EEG-nummer.

7.1.1. Voor de stoffen in bijlage I van dit besluit staat op het etiket bovendien de vermelding "EEG-etikettering".

7.1.2. Uiteindelijke keuze van waarschuwingszinnen en veiligheidsaanbevelingen

Hoewel de uiteindelijke keuze van waarschuwingszinnen en veiligheidsaanbevelingen in de eerste plaats wordt bepaald door de noodzaak alle benodigde informatie te verschaffen, dient ook te worden gelet op de duidelijkheid en het effect van het etiket. Met het oog op de duidelijkheid dienen voor de noodzakelijke informatie zo weinig mogelijk zinnen te worden gebruikt.

Voor irriterende, licht ontvlambare, ontvlambare of oxiderende stoffen behoeven de R- en S-zinnen niet te worden vermeld indien de inhoud van de verpakking niet meer dan 125 ml bedraagt. Dit geldt eveneens voor de schadelijke stoffen, bij dezelfde inhoud, die niet in de detailhandel aan het publiek worden verkocht.

7.1.3. Vermeldingen als "niet vergiftig", "niet schadelijk" of vergelijkbare vermeldingen mogen niet voorkomen op het etiket of de verpakking van de stoffen waarvoor dit besluit geldt en van de preparaten waarvoor het K.B. van 11 januari 1993 geldt.

7.1.4. In bijlage II van het K.B. van 11 januari 1993 worden speciale bepalingen met betrekking tot het etiketteren van bepaalde preparaten vermeld.

7.2. Op het etiket aan te brengen scheikundige benaming(en)

7.2.1. Voor de stoffen die in bijlage I van dit besluit zijn vermeld moet de naam van de stof op het etiket overeenkomen met één van de benamingen die in bijlage I voorkomen.

Voor stoffen die niet in bijlage I worden genoemd, wordt de benaming vastgesteld volgens de in paragraaf 1.4 genoemde internationaal erkende chemische nomenclatuur.

7.2.2. Voor preparaten wordt bij de keuze van de benamingen die op het etiket moeten worden vermeld de bepalingen van artikel 9, § 1, onder c), van het K.B. van 11 januari 1993 gevolgd.

Opmerking

Bij "geconcentreerde preparaten die bestemd zijn voor de parfumindustrie" :

— hoeft de persoon die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen ervan alleen maar die overgevoeligheid veroorzakende stof te identificeren die volgens hem in eerste instantie voor eventuele overgevoeligheid verantwoordelijk is;

— mag, wanneer het om een natuurlijke stof gaat, de chemische benaming van het type "eterische olie van" of "extract van" zijn en behoeven niet zozeer de namen van de bestanddelen van die vluchtige olie of van dat extract te worden genoemd.

7.3. Keuze van gevaarsymbolen

De gevaarsymbolen en -aanduidingen dienen overeen te stemmen met bijlage II. De symbolen moeten in zwart op een oranjegele achtergrond worden gedrukt.

7.3.1. Voor stoffen van bijlage I moeten de in die bijlage vermelde gevaarsymbolen en -aanduidingen worden gebruikt.

7.3.2. Voor gevaarlijke stoffen die nog niet in bijlage I zijn opgenomen en voor preparaten worden de gevaarsymbolen en -aanduidingen toegewezen volgens de regels van deze bijlage.

Indien aan een stof meer dan één symbool is toegewezen :

— maakt de verplichting symbool T aan te brengen het aanbrengen van de symbolen X en C facultatief;

— maakt de verplichting symbool C aan te brengen het aanbrengen van symbool X facultatief;

— maakt de verplichting symbool E aan te brengen het aanbrengen van de symbolen F en O facultatief.

7.4. Keuze van R-zinnen

De tekst van de R-zinnen moet overeenkomen met die in bijlage III van dit besluit.

Indien van toepassing moeten de gecombineerde R-zinnen van bijlage III worden gebruikt.

7.4.1. Voor de stoffen van bijlage I zijn de R-zinnen die uit de bijlage.

7.4.2. Voor stoffen die niet in bijlage I zijn opgenomen, worden de R-zinnen gekozen overeenkomstig de volgende criteria en prioriteiten :

a) in geval van gevaar voor de gezondheid :

(i) R-zinnen die overeenkomen met de gevaarscategorie die met een symbool wordt geïllustreerd— deze zinnen moeten op het etiket zijn vermeld;

(ii) R-zinnen die overeenkomen met andere gevaarscategorieën die krachtens artikel 8, § 1, van dit besluit niet met een symbool worden geïllustreerd.

b) in geval van gevaar als gevolg van fysisch-chemische eigenschappen :

— de in 7, 4, 2, onder a), genoemde criteria zijn van toepassing, zij het dat de waarschuwingzinnen "zeer licht ontvlambaar" en "licht ontvlambaar" niet behoeven te worden aangebracht wanneer zij de tekst van de bij het symbool gebruikte gevaarsaanduiding herhalen.

c) in geval van gevaar voor het milieu :

— de R-zinnen die overeenkomen met de indelingscategorie "milieugevaarlijk" — deze zinnen moeten op het etiket zijn vermeld.

7.4.3. Voor preparaten worden de R-zinnen gekozen overeenkomstig de volgende criteria en prioriteiten :

a) in geval van gevaar voor de gezondheid :

(i) R-zinnen die overeenkomen met de gevaarscategorie die met een symbool wordt geïllustreerd. In bepaalde gevallen moeten de R-zinnen overeenkomstig de tabellen van bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993 worden aangepast. Meer in het bijzonder moeten de R-zinnen van de component(en) die verantwoordelijk is/zijn voor het toekennen van een gevaarscategorie aan een preparaat op het etiket zijn vermeld;

(ii) R-zinnen die overeenkomen met andere gevaarscategorieën die aan de componenten zijn toegekend maar die krachtens artikel 9, § 1, onder d), van het K.B. van 11 januari 1993 niet met een symbool worden geïllustreerd.

b) in geval van gevaar als gevolg van fysisch-chemische eigenschappen :

— de in 7.4.3, onder a), genoemde criteria zijn van toepassing, zij het dat de waarschuwingsszinnen "zeer licht ontvlambaar" en "licht ontvlambaar" niet behoeven te worden aangebracht wanneer zij de tekst van de bij het symbool gebruikte gevaarsaanduiding herhalen.

In het algemeen is voor preparaten een maximum van vier R-zinnen voldoende om het gevaar te beschrijven; hierbij worden de gecombineerde zinnen van bijlage III steeds als één zin beschouwd. De standaardzinnen moeten echter alle met het preparaat verband houdende belangrijke gevaren bestrijken.

Wanneer de fabrikant het evenwel nodig vindt te wijzen op gevaren voor het milieu, moeten, zo nodig, aanvullende R-zinnen worden toegevoegd.

7.5. Veiligheidsaanbevelingen

De tekst van de S-zinnen moet overeenkomen met die in bijlage IV van dit besluit.

Indien van toepassing moeten de gecombineerde S-zinnen van bijlage IV worden gebruikt.

7.5.1. Voor de stoffen van bijlage I zijn de S-zinnen die uit de bijlage. Daar waar geen S-zinnen worden vermeld mag de fabrikant/importeur (een) geschikte S-zin(nen) opnemen.

7.5.2. Keuze van veiligheidsaanbevelingen

De uiteindelijke keuze van veiligheidsaanbevelingen moet zijn afgestemd op de op het etiket aangebrachte waarschuwingsszinnen en op het beoogde gebruik van de stof of het preparaat :

— in het algemeen is een maximum van vier S-zinnen voldoende om de meest geschikte veiligheidsaanbeveling te formuleren; hierbij worden de gecombineerde zinnen van bijlage IV steeds als één zin beschouwd;

— in geval van gevaar voor het milieu dient een minimum van één en een maximum van vier S-zinnen te worden gebruikt;

— bepaalde R-zinnen worden overbodig indien een zorgvuldige selectie van S-zinnen wordt gemaakt en vice versa; S-zinnen die duidelijk overeenkomen met R-zinnen worden alleen op het etiket vermeld als het de bedoeling is nadruk op een bepaalde waarschuwing te leggen;

— bijzondere aandacht bij de keuze van veiligheidsaanbevelingen moet worden geschonken aan de verwachte gebruiksomstandigheden van bepaalde stoffen en preparaten, bij voorbeeld sproeien of andere aerosoleffecten. Bij de keuze van de zinnen moet op het beoogde gebruik worden gelet;

— de veiligheidsaanbevelingen S1, S2 en S45 zijn verplicht voor alle zeer giftige, giftige en bijtende stoffen en preparaten die aan het publiek worden verkocht;

— de veiligheidsaanbevelingen S2 en S46 zijn verplicht voor alle andere gevaarlijke stoffen (behalve stoffen, die zijn ingedeeld als milieugevaarlijk) en preparaten die aan het publiek worden verkocht.

7.6. Het EEG-nummer

Als een op het etiket genoemde stof is opgenomen in de Europese inventaris van de in de handel bestaande chemische stoffen (Einecs) of in de Europese lijst van bekendgemaakte stoffen (Elincs), moet het Einecs- of Elincs-nummer van de stof op het etiket worden vermeld. Die vereiste geldt niet voor preparaten.

8. SPECIALE GEVALLEN : STOFFEN

8.1. Mobiele gascilinders

Voor mobiele gashouders geldt dat aan de etiketteringseisen geacht wordt te zijn voldaan wanneer die in overeenstemming zijn met artikel 8, § 1, of § 2, onder 6°b, van dit besluit.

In afwijking van artikel 8, § 2, 1° en 2°, kunnen bij gascilinders met een watercapaciteit van 150 liter of minder één van de volgende alternatieven worden gebruikt :

— het formaat en de afmetingen van het etiket kunnen de voorschriften volgen van de ISO Standaard ISO/DP 7225;

— de in artikel 8, § 1, 1° gespecificeerde informatie kan geleverd worden middels duurzaam op de cilinder aangebrachte informatie in de vorm van een schijf of etiket.

8.2. Metalen in massieve vorm

Deze stoffen zijn ingedeeld in bijlage I van dit besluit of zullen in overeenstemming met artikel 3, § 4 van dit besluit worden ingedeeld. Enkele van deze stoffen vormen, hoewel ze zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 1, § 4 van dit besluit, in de vorm waarin ze in de handel zijn gebracht echter geen gevaar voor de gezondheid van de mens bij inademing, opname door de mond of aanraking met de huid. Dergelijke stoffen hebben op grond van artikel 8, § 1 van dit besluit geen etiket nodig. Alle informatie die op het etiket zou hebben moeten staan, dient evenwel door de persoon die voor het in de handel brengen van het metaal verantwoordelijk is in de vorm bedoeld in artikel 9, § 2 van bovengenoemd besluit aan de gebruiker te worden verstrekt.

9. SPECIALE GEVALLEN : PREPARATEN

9.1. Gasvormige preparaten (gasmengsels)

Bij gasvormige preparaten moet aandacht worden geschonken aan :

— de beoordeling van de fysisch-chemische eigenschappen;

— de beoordeling van de gevaren voor de gezondheid.

9.1.1. Beoordeling van de fysisch-chemische eigenschappen

9.1.1.1. Ontvlambaarheid

De ontvlambaarheidseigenschappen van deze preparaten worden vastgesteld overeenkomstig artikel 5, § 2, van het K.B. van 11 januari 1993 volgens de in bijlage V, deel A, van dit besluit vermelde methoden.

Deze preparaten worden ingedeeld op basis van de resultaten van de uitgevoerde testen, de criteria van bijlage V en de criteria in de handleiding voor het kenmerken.

In afwijking hiervan kan, wanneer het gaat om gasvormige preparaten die in kleine hoeveelheden op bestelling worden vervaardigd, de ontvlambaarheid van deze gasmengsels met de volgende berekeningsmethode worden beoordeeld : de mathematische expressie van het gasmengsel

$$A_1 F_1 + \dots + A_i F_i + \dots + A_n F_n + B_1 I_1 + \dots + B_i I_i + \dots + B_p I_p$$

waarin :

A_i en B_i de molaire fracties zijn,

F_i de massa ontvlambaar gas is,

I_i de massa inert gas is,

n het aantal ontvlambare gassen is,

p het aantal inerte gassen is,

kan, door een coëfficiënt K_i te gebruiken, worden omgezet in een vorm waarin al de I_i (inerte gassen) worden uitgedrukt in een stikstofequivalent en waarin de equivalente hoeveelheid ontvlambaar gas A'_i als volgt wordt uitgedrukt :

$$A'_i = A_i \times \left(\frac{100}{A_i + K_i B_i} \right)$$

Door gebruikmaking van de waarde van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas dat in een mengsel met stikstof een samenstelling geeft die niet aan de lucht ontvlambaar is (T_{ci}), kan de volgende formule worden verkregen :

$$\sum_i A'_i / T_{ci} \leq 1$$

Het gasmengsel is ontvlambaar indien de waarde in bovenstaande formule groter is dan 1. Het preparaat wordt als zeer licht ontvlambaar ingedeeld en krijgt de waarschuwingzin R12 toegekend.

Equivalentiecoëfficiënten (K_i)

De waarden van de equivalentiecoëfficiënten (K_i) tussen de inerte gassen en stikstof en de waarden van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas (T_{ci}) kunnen worden gevonden in de tabellen 1 en 2 van de ISO-norm ISO 10156 editie 15.12.90.

Maximale hoeveelheid ontvlambaar gas (T_{ci})

De waarde van de maximale hoeveelheid ontvlambaar gas (T_{ci}) kan worden gevonden in tabel 2 van de ISO-norm ISO 10156 editie 15.12.90.

Wanneer in bovengenoemde tabel een T_{ci} -waarde van een ontvlambaar gas niet voorkomt, moet de bijbehorende lager explosiviteitslimiet (LEL) worden gebruikt. Als geen LEL-waarde bestaat, wordt de waarde van T_{ci} gesteld op 1 vol. %.

Opmerkingen

— Bovengenoemde formule kan worden gebruikt voor een geschikte etikettering van gasvormige preparaten doch dient niet te worden gezien als een methode ter vervanging van proefnemingen voor de bepaling van technische veiligheidsparameters.

— Bovendien wordt middels deze formule geen informatie gegeven in hoeverre een mengsel dat oxiderende gassen bevat, veilig kan worden vervaardigd. Bij de berekening van de ontvlambaarheid worden deze oxiderende gassen niet in beschouwing genomen.

— Bovenstaande formule levert alleen betrouwbare resultaten op als de ontvlambare gassen elkaar wat hun ontvlambaarheid betreft niet beïnvloeden. Hiermee dient rekening te worden gehouden bij bijvoorbeeld gehalogeneerde koolwaterstoffen.

9.1.1.2. Oxiderende eigenschappen

Aangezien bijlage V van dit besluit geen methode voor de bepaling van oxiderende eigenschappen van gasmengsels bevat, moet de beoordeling van deze eigenschappen overeenkomstig de volgende schattingsmethode geschieden.

Het uitgangspunt van de methode is het vergelijken van het oxiderend vermogen van gassen in een mengsel met het oxiderend vermogen van zuurstof in de lucht. De concentraties van gassen in het mengsel worden uitgedrukt in volumeprocenten.

Men gaat ervan uit dat het gasmengsel even of sterker oxiderend is dan lucht, wanneer aan de volgende voorwaarde is voldaan :

$$\sum_i x_i C_i \geq 21$$

waarin :

x_i de concentratie van gas i in volumeprocenten is,

C_i de zuurstofequivalentie-coëfficiënt is.

In dit geval wordt het preparaat als oxiderend ingedeeld en krijgt het de zin R8 toegekend.

Equivalentiecoëfficiënten tussen oxiderende gassen en zuurstof

De coëfficiënten die worden gebruikt in de berekening ter bepaling van het oxiderend vermogen van bepaalde gassen in een mengsel ten opzichte van het oxiderend vermogen van zuurstof in de lucht, opgenomen onder 5.2 in de ISO-norm ISO 10156 editie 15.12. 90, zijn de volgende :

O ₂	1
N ₂ O	0,6

Wanneer in de eerdergenoemde norm voor een gas geen C₁-coëfficiënt wordt opgegeven, wordt aan deze coëfficiënt de waarde 40 toegekend.

9.1.2. Beoordeling van de effecten op de gezondheid

De beoordeling van de gevaren van een preparaat voor de gezondheid geschiedt overeenkomstig artikel 5, § 3, van het K.B. van 11 januari 1993.

Wanneer de beoordeling van de gevaren voor de gezondheid geschiedt overeenkomstig de in artikel 5, § 5, van het K.B. van 11 januari 1993 vermelde conventionele methode, waarbij gebruik wordt gemaakt van concentratiegrenzen per stof, worden de te gebruiken afzonderlijke concentratiegrenzen uitgedrukt in volumepercenten en vermeld in :

— hetzij bijlage I van dit besluit voor het/de betrokken gas(sen);

— hetzij bijlage I van het K.B. van 11 januari 1993, tabel I A tot en met VI A wanneer het/de betrokken gas(sen) niet in bijlage I voorkomt/voorkomen of daarin wordt/worden genoemd zonder de bijbehorende concentratiegrenzen.

9.1.3. Etikettering

Voor mobiele gashouders geldt dat aan de etiketteringseisen geacht wordt te zijn voldaan wanneer die in overeenstemming zijn met artikel 10, § 5, van het K.B. van 11 januari 1993.

In afwijking van artikel 10, §§ 1 en 2 van het K.B. van 11 januari 1993 kunnen bij gascilinders met een watercapaciteit van 150 liter of minder voor de opmaak en de afmetingen van het etiket evenwel de bepalingen van de ISO-norm ISO/DP 7225 worden gevolgd. In dit geval mag het etiket de gangbare benaming of industriële/handelsbenaming van het preparaat dragen, vooropgesteld dat de namen van de gevaarlijke stoffen in het preparaat duidelijk en onuitwisbaar op de buitenkant van de gascilinder worden vermeld.

9.2. Legeringen, preparaten die polymeren bevatten, preparaten die elastomeren bevatten

Deze preparaten worden ingedeeld in overeenstemming met de bepalingen van artikel 5 en gekenmerkt overeenkomstig de bepalingen van artikel 9 van het K.B. van 11 januari 1993.

Enkele van deze preparaten vormen, hoewel ze zijn ingedeeld overeenkomstig artikel 5, in de vorm waarin ze in de handel zijn gebracht echter geen gevaar voor de gezondheid van de mens bij inademing, opname door de mond of aanraking met de huid. Dergelijke stoffen hebben op grond van artikel 9 geen etiket nodig. Alle informatie die op het etiket zou hebben moeten staan, dient evenwel door middel van een informatiesysteem in de vorm bedoeld in artikel 12 van bovengenoemde besluit aan de professionele gebruiker te worden verstrekt.

9.3. Organische peroxiden

Organische peroxiden combineren de eigenschappen van een oxiderende en een brandbare stof in één molecuul : wanneer een organisch peroxide uiteenvalt, reageert het oxiderende deel van het molecuul exotherm met het brandbare (oxideerbare) deel. De bestaande methoden van bijlage V kunnen niet op organische peroxiden worden toegepast om oxiderende eigenschappen aan te tonen.

De volgende op de aanwezigheid van actieve zuurstof gebaseerde methode moet worden gebruikt.

Het beschikbare zuurstofgehalte (%) van een organisch peroxide preparaat wordt gegeven door de formule :

$$16 \times \sum (ni \times ci / mi)$$

waarin :

ni het aantal peroxigroepen per molecuul organisch peroxide i is;

ci de concentratie (massa %) van organisch peroxide i is;

mi de moleculaire massa van organisch peroxide i is.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

Annexe VI

Critères généraux de classification et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. La classification vise à identifier toutes les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques des substances ainsi que les propriétés physico-chimiques et toxicologiques d'une préparation pouvant constituer un risque lors de leur manipulation ou de leur utilisation normale. Après identification de chaque propriété dangereuse, la substance ou la préparation doit être étiquetée de manière à indiquer le(s) danger(s) afin de protéger l'utilisateur, le grand public et l'environnement.

1.2. La présente annexe énumère les principes généraux régissant la classification et l'étiquetage des substances et préparations, visés à l'article 3, § 3 du présent arrêté et à l'article 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993, ainsi que dans d'autres arrêtés appropriés relatifs aux préparations dangereuses.

Elle s'adresse à toute personne concernée (fabricants, importateurs, autorités nationales) par les méthodes de classification et d'étiquetage des substances et préparations dangereuses.

1.3. Les prescriptions du présent arrêté et de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 ont pour objet de mettre à la disposition du grand public et des travailleurs un outil fondamental contenant des informations essentielles en matière de substances et préparations dangereuses. L'étiquette attire l'attention des personnes qui manipulent ou utilisent ces substances et préparations sur les dangers inhérents à certaines d'entre elles.

L'étiquette peut également avoir pour objet de fournir une information plus complète sur les mesures de prudence et les modalités d'utilisation des produits disponibles sous des formes différentes.

1.4. L'étiquette tient compte de tous les dangers potentiels susceptibles d'être liés à la manipulation et à l'utilisation normales des substances et préparations dangereuses sous la forme où elles sont mises sur le marché, mais non nécessairement sous n'importe quelle forme différente d'utilisation finale, par exemple à l'état dilué. Les dangers les plus sérieux sont illustrés par des symboles et ces dangers, ainsi que ceux qui découlent d'autres propriétés dangereuses, sont énoncés par des phrases types de risque tandis que les phrases indiquant des conseils de prudence précisent les précautions indispensables à respecter.

Dans le cas des substances, l'information est complétée par la mention du nom de la substance conforme à une nomenclature chimique reconnue au niveau international, de préférence le nom utilisé dans l'Inventaire européen des produits chimiques commercialisés (Einecs) ou la Liste européenne des substances chimiques notifiées (Elincs), ainsi que par la mention du numéro CEE, des noms, adresse et numéro de téléphone de la personne, établie dans la Communauté, responsable de la commercialisation de la substance.

Dans le cas des préparations, l'information est complétée par l'indication de la désignation ou du nom commercial de la préparation, par l'indication du nom chimique des substances présentes dans la préparation conformément à l'article 9 § 1 point c) de l'A.R. du 11 janvier 1993, ainsi que par l'indication des noms, adresse et numéro de téléphone de la personne, établie dans la Communauté, responsable de la commercialisation de la préparation.

1.5. L'article 3, § 4 du présent arrêté stipule que les fabricants, distributeurs et importateurs de substances dangereuses ne figurant pas encore à l'annexe I mais énumérées dans l'Einecs, sont tenus d'effectuer une recherche afin de prendre connaissance des données pertinentes et accessibles existantes concernant les propriétés de ces substances. Sur la base de ces informations, ils doivent emballer et provisoirement étiqueter ces substances conformément aux règles établies aux articles 7 et 8 et aux critères fixés à la présente annexe.

1.6. Pour les substances, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent être obtenues de la façon suivante :

a) En ce qui concerne les substances qui nécessitent la communication des informations visées à l'annexe VII, la plupart des indications requises pour la classification et l'étiquetage figureront au « dossier de base ». Cette classification et cet étiquetage seront revus, le cas échéant, lorsqu'on disposera d'informations supplémentaires (annexe VIII).

b) En ce qui concerne les autres substances (par exemple, celles qui sont visées à la section 1.5 ci-dessus), les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent, le cas échéant, être obtenues à partir d'un certain nombre de sources différentes telles que les résultats d'essais antérieurs, les informations exigées au titre de la réglementation internationale des transports de matières dangereuses, les informations tirées de travaux de référence et la bibliographie ou les informations fondées sur l'expérience pratique.

Pour les préparations, les données requises pour la classification et l'étiquetage peuvent être obtenues :

a) si elles concernent des données physico-chimiques, par l'application des méthodes précisées à l'annexe V du présent arrêté. Pour les préparations gazeuses, une méthode de calcul peut être utilisée pour les propriétés d'inflammabilité et comburantes (voir le chapitre 9);

b) si elles concernent des données relatives aux effets sur la santé :

— par l'application des méthodes précisées à l'annexe V du présent arrêté et/ou par l'application de la méthode conventionnelle visée à l'article 5, paragraphe 5 points a) à i) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993,

— si elles concernent toutefois l'évaluation des propriétés cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction, par l'application de la méthode conventionnelle visée à l'article 5 paragraphe 5 points j) à q) de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Note relative à la réalisation d'essais sur des animaux

La réalisation d'essais sur des animaux pour obtenir des données expérimentales est soumise aux prescriptions de l'A.R. du 14 novembre 1993 relatif à la protection des animaux d'expérience.

1.7. Application des critères du guide

La classification doit couvrir les propriétés toxicologiques et physico-chimiques des substances et préparations et, de surcroît, les propriétés écotoxicologiques des substances.

La classification des substances et préparations s'effectue sur la base des critères repris aux chapitres 2 à 4 et, en outre pour les substances, au chapitre 5 de la présente annexe. Tous les types de risques doivent être envisagés. Par exemple, une classification à la section 3.2.1 n'implique pas que l'on perde de vue les sections telles que 3.2.2 ou 3.2.4.

La sélection du (des) symbole(s) et de la (des) phrase(s) de risque s'effectue sur la base de la classification pour garantir que la nature spécifique des dangers potentiels identifiés lors de la classification figure sur l'étiquette.

Nonobstant les critères indiqués dans les sections 2.2.3, 2.2.4 et 2.2.5, les substances et préparations se trouvant sous forme d'aérosols sont soumises aux critères d'inflammabilité de l'article 1^{er}, 9^o et de l'article 3, § 1^{er}, f de l'A.R. du 14 avril 1978 relatif aux générateurs aérosols.

1.7.1. Définitions

On entend par « substances » les éléments chimiques et leurs composés à l'état naturel ou tels qu'obtenus par tout procédé de production, contenant tout additif nécessaire pour préserver la stabilité du produit et toute impureté dérivant du procédé, à l'exclusion de tout solvant qui peut être séparé sans affecter la stabilité de la substance ni modifier sa composition.

Une substance peut être très bien définie sur le plan chimique (par exemple l'acétone) ou être un mélange complexe de composants de composition variable (par exemple les distillats aromatiques). Pour certaines substances complexes, des composants individuels sont parfois identifiés.

On entend par « préparations » les mélanges ou solutions composés de deux substances ou plus.

1.7.2. Application des critères du guide pour les substances

Les critères d'orientation figurant à la présente annexe sont directement applicables lorsque les données ont été obtenues à partir de méthodes d'essais comparables à celles qui sont reprises à l'annexe V. Dans les autres cas, on appréciera les données disponibles en comparant les méthodes d'essai utilisées avec celles qui figurent à l'annexe V et avec les règles appropriées de classification et d'étiquetage visées à la présente annexe.

1.7.2.1. Classification des substances contenant des impuretés, des additifs ou des composants individuels

Lorsque des impuretés, des additifs ou des composants individuels de substances ont été identifiés, ils doivent être pris en compte si leur concentration est égale ou supérieure aux limites de concentration fixées à :

— 0,1 % pour les substances classées comme très toxiques, toxiques, cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction de catégorie 1 ou 2,

— 1 % pour les substances classées comme nocives, corrosives, irritantes, sensibilisantes, ou cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction de catégorie 3,

sauf si des valeurs inférieures ont été fixées à l'annexe I du présent arrêté.

A l'exception des substances spécifiquement reprises à l'annexe 1, la classification relative aux propriétés physico-chimiques et aux risques pour la santé doit s'effectuer conformément aux dispositions de l'article 5 et l'étiquetage doit s'effectuer conformément aux dispositions de l'article 9 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

La classification relative aux propriétés physico-chimiques s'effectue en fonction des critères visés au chapitre 2 et la classification relative aux effets dangereux pour l'environnement en fonction des critères visés au chapitre 5 de la présente annexe.

Dans le cas de l'amiante (650-013-00-6), cette règle générale n'est pas d'application tant qu'une limite de concentration n'est pas fixée à l'annexe 1. Les substances contenant de l'amiante doivent être classées et étiquetées selon les principes de l'article 3, § 4 du présent arrêté.

1.7.3. Application des critères du guide pour les préparations

Les critères d'orientation figurant à la présente annexe sont directement applicables lorsque les données ont été obtenues à partir de méthodes d'essai comparables à celles qui sont reprises à l'annexe V, à l'exception des critères du chapitre 4 auxquels s'applique uniquement la méthode conventionnelle.

Dans les autres cas, on appréciera les données disponibles en comparant les méthodes d'essai utilisées avec celles qui figurent à l'annexe V et avec les règles appropriées de classification et d'étiquetage, visées à la présente annexe.

Si les risques pour la santé sont évalués en appliquant la méthode conventionnelle visée à l'article 5 paragraphe 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993, il y a lieu d'utiliser les limites individuelles de concentration fixées :

— soit à l'annexe I du présent arrêté,

— soit à l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances ne figurent pas à l'annexe I du présent arrêté ou y figurent sans limite de concentration.

Dans le cas des préparations contenant des mélanges de gaz, la classification relative aux effets sur la santé sera établie par la méthode de calcul sur la base des limites individuelles de concentration fixées à l'annexe I du présent arrêté ou, si ces limites n'y figurent pas, sur la base des critères de l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993.

1.7.3.1. Préparations ou substances décrites à la section 1.7.2.1 utilisées comme composants d'une autre préparation

L'étiquetage de telles préparations doit être conforme aux prescriptions de l'article 9, conformément aux conditions prévues à l'article 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Dans certains cas, les informations figurant sur l'étiquette de la préparation ou de la substance décrite à la section 1.7.2.1 sont néanmoins insuffisantes pour permettre à d'autres fabricants, désireux de l'utiliser comme constituant de leur(s) propre(s) préparation(s), d'effectuer correctement la classification et l'étiquetage de leur(s) préparation(s).

Dans ces cas, la personne établie dans la Communauté Européenne responsable de la mise sur le marché de la préparation initiale ou de la substance initiale décrite à la section 1.7.2.1, qu'elle en soit le fabricant, l'importateur ou le distributeur, doit fournir, sur demande justifiée et dès que possible, toutes les données nécessaires sur les substances dangereuses présentes pour permettre une classification et un étiquetage corrects de la nouvelle préparation. Ces données sont également nécessaires pour permettre à la personne responsable de la mise sur le marché de la nouvelle préparation de se conformer aux autres prescriptions de l'A.R. du 11 janvier 1993.

2. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

2.1. Introduction

Les méthodes d'essai relatives aux propriétés d'explosibilité, aux propriétés comburantes et aux propriétés d'inflammabilité, figurant à l'annexe V du présent arrêté, visent à conférer une signification spécifique aux définitions générales visées à l'article 1 paragraphe 4 points a) à e) du dit arrêté. Les critères suivent directement les méthodes d'essai visées à l'annexe V, dans la mesure où ceux-ci sont mentionnés.

S'il existe une information adéquate montrant que, dans la pratique, les propriétés physico-chimiques des substances et préparations (à l'exception des peroxydes organiques) diffèrent de celles qui résultent de l'application des méthodes d'essai figurant à l'annexe V, ces substances et préparations devront être classées selon le risque éventuel qu'elles présentent pour les personnes qui les manipulent ou pour d'autres personnes.

2.2. Critères de classification, choix des symboles et indication de danger, et choix des phrases indiquant les risques

Dans le cas des préparations, il faut prendre en considération les critères visés à l'article 5 paragraphe 2 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

2.2.1. Substances et préparations explosibles

Les substances et préparations seront classées comme explosibles et caractérisées par le symbole « E » et par l'indication de danger « explosif » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V et dans la mesure où elles sont explosibles sous leur forme commercialisée. L'inscription d'une phrase indiquant les risques est obligatoire; elle sera libellée compte tenu de ce qui suit.

R2 Risque d'explosion par le choc, par la friction, par le feu ou par d'autres sources d'ignition

Substances et préparations, sauf les exceptions indiquées ci-dessous.

R3 Grand risque d'explosion par le choc, par la friction, par le feu ou par d'autres sources d'ignition

Substances et préparations particulièrement sensibles telles que les sels de l'acide picrique, le tétranitrate de pentaérythritol (penthrite).

2.2.2. Substances et préparations comburantes

Les substances et préparations seront classées comme comburantes et caractérisées par le symbole « O » et par l'indication de danger « comburant » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. L'inscription d'une phrase indiquant les risques est obligatoire; elle sera libellée sur la base des résultats des essais, compte tenu de ce qui suit.

R7 Peut provoquer un incendie

Peroxydes organiques qui ont des caractéristiques inflammables, même lorsqu'ils ne sont pas en contact avec d'autres matériaux combustibles.

R8 Favorise l'inflammation des matières combustibles

Autres substances et préparations comburantes, y compris les peroxydes inorganiques, qui peuvent enflammer ou augmenter le risque d'inflammabilité lorsqu'elles sont en contact avec des matériaux combustibles.

R9 Peut exploser en mélange avec des matières combustibles

Autres substances et préparations, y compris les peroxydes inorganiques, devenant explosibles lorsqu'elles sont mélangées avec des matériaux combustibles, par exemple certains chlorates.

2.2.2.1. Remarques relatives aux peroxydes

En ce qui concerne les propriétés comburantes, les méthodes existant à l'annexe V ne peuvent s'appliquer aux peroxydes organiques.

Pour les substances, les peroxydes organiques sont classés comme comburants sur la base de leur structure (par exemple R-O-O-H; R₁-O-O-R₂).

Les préparations seront classées à l'aide de la méthode de calcul basée sur la présence d'oxygène actif, présentée à la section 9.3.

Tout peroxyde organique ou toute préparation de peroxyde organique est classé comme comburant si le peroxyde ou sa formulation contient :

— plus de 5 % de peroxydes organiques

ou

— plus de 0,5 % d'oxygène disponible à partir des peroxydes organiques et pas plus de 5 % de peroxyde d'hydrogène.

2.2.3. Substances et préparations extrêmement inflammables

Les substances et préparations seront classées comme extrêmement inflammables et caractérisées par le symbole « F + » et par l'indication de danger « extrêmement inflammable » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. La phrase indiquant les risques sera attribuée selon les critères suivants :

R12 Extrêmement inflammable

— Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est inférieur à 0 °C et la température d'ébullition (ou bien, dans le cas d'un intervalle de distillation, la température initiale d'ébullition) inférieure ou égale à 35°C.

— Substances et préparations gazeuses qui, à température et à pression ambiante, sont inflammables à l'air.

2.2.4. Substances et préparations facilement inflammables

Les substances et préparations seront classées comme facilement inflammables et caractérisées par le symbole « F » et par l'indication de danger « facilement inflammable » en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. Des phrases indiquant les risques seront attribuées selon les critères suivants :

R11 Facilement inflammable

— Substances et préparations solides, susceptibles de s'enflammer facilement après un bref contact avec une source d'inflammation, et qui continuent à brûler ou à se consumer après élimination de cette source.

— Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est inférieur à 21 °C, mais qui ne sont pas extrêmement inflammables.

R15 Au contact de l'eau, dégage des gaz extrêmement inflammables
Substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent des gaz extrêmement inflammables en quantités dangereuses à raison de 1 l/kg/h au minimum.

R17 Spontanément inflammable à l'air

Substances et préparations susceptibles de s'échauffer et, finalement, de s'enflammer au contact de l'air à la température ambiante, sans apport d'énergie.

2.2.5. Substances et préparations inflammables

Les substances et préparations seront classées comme inflammables en fonction des résultats des essais visés à l'annexe V. La phrase indiquant les risques sera attribuée selon les critères suivants :

R10 Inflammable

Substances et préparations liquides dont le point d'éclair est égal ou supérieur à 21 °C et inférieur ou égal à 55°C.

Toutefois, en pratique, il a été démontré que les préparations ayant un point d'éclair égal ou supérieur à 21 °C et inférieur ou égal à 55 °C n'ont pas besoin d'être classées inflammables si la préparation ne peut en aucune façon favoriser la combustion et seulement s'il n'y a aucun risque à craindre pour les personnes manipulant ces préparations ou pour les autres personnes.

2.2.6. Autres propriétés physico-chimiques

Des phrases complémentaires indiquant les risques seront attribuées aux substances et préparations classées conformément aux sections 2.2.1 à 2.2.5 ci-dessus ou aux chapitres 3, 4 et 5 ci-après, compte tenu des critères suivants (sur la base de l'expérience acquise lors de l'élaboration de l'annexe I) :

R1 Explosif à l'état sec

Substances et préparations explosibles mises sur le marché en solution ou sous forme humide, par exemple la nitrocellulose contenant plus de 12,6 % d'azote.

R4 Forme des composés métalliques explosifs très sensibles

Substances et préparations susceptibles de donner naissance à des dérivés métalliques sensibles explosifs, par exemple l'acide picrique, l'acide styphnique.

R5 Danger d'explosion sous l'action de la chaleur

Substances et préparations instables à la chaleur, non classées comme explosibles, par exemple l'acide perchlorique > 50 %.

R6 Danger d'explosion en contact ou sans contact avec l'air

Substances et préparations instables à la température ambiante, par exemple l'acétylène.

R7 Peut provoquer un incendie

Substances et préparations réactives, par exemple le fluor, l'hydrosulfite de sodium.

R14 Réagit violemment au contact de l'eau

Substances et préparations réagissant fortement avec l'eau, par exemple le chlorure d'acétyle, les métaux alcalins, le tétrachlorure de titane.

R16 Peut exploser en mélange avec des substances comburantes

Substances et préparations réagissant de manière explosive en présence d'agents comburants, par exemple le phosphore rouge.

R18 Lors de l'utilisation, formation possible de mélange vapeur-air inflammable/explosif

Préparations non classées comme inflammables en tant que telles, contenant des composants volatils inflammables à l'air.

R19 Peut former des peroxydes explosifs

Substances et préparations susceptibles de former des peroxydes explosifs pendant le stockage, par exemple l'éther éthylique, le 1,4-dioxane.

R30 Peut devenir facilement inflammable pendant l'utilisation

Préparations non classées comme inflammables en tant que telles, mais susceptibles de devenir inflammables par perte de composants volatils non inflammables.

R44 Risque d'explosion si chauffé en ambiance confinée

S'applique aux substances et préparations qui ne sont pas en elles-mêmes classées comme explosibles conformément à la section 2.2.1 ci-dessus, mais qui peuvent néanmoins présenter en pratique des propriétés explosives lorsqu'elles sont chauffées dans une ambiance suffisamment confinée. Ainsi, certaines substances qui se décomposeraient d'une manière explosive si elles étaient chauffées dans un récipient en acier ne présentent pas cette caractéristique lorsqu'elles sont chauffées dans des récipients moins résistants.

Pour les autres phrases complémentaires indiquant les risques, voir la section 3.2.7.

3. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES PROPRIÉTÉS TOXICOLOGIQUES

3.1. Introduction

3.1.1. La classification concerne à la fois les effets aigus et à long terme des substances et préparations, que ces effets découlent d'une seule exposition ou d'expositions répétées ou prolongées.

S'il est pertinemment démontré que, dans la pratique, les effets toxiques pour l'homme des substances et préparations diffèrent ou sont susceptibles de différer des effets mis en lumière par les résultats des expériences pratiquées sur des animaux ou par l'application de la méthode conventionnelle visée à l'article 5 paragraphe 5 de l' A.R. du 11 janvier 1993, ces substances et préparations seront classées en fonction de leur toxicité pour l'homme. Toutefois, les essais sur l'homme doivent être déconseillés et ne peuvent pas normalement servir à annuler des données positives issues d'essais sur des animaux.

3.1.2. La classification des substances doit s'opérer sur la base des données expérimentales disponibles, selon les critères suivants qui tiennent compte de l'importance de ces effets :

- a) pour la toxicité aiguë (effets létaux et irréversibles après une seule exposition), il faut utiliser les critères des sections 3.2.1 à 3.2.3;
- b) pour la toxicité subaiguë, subchronique ou chronique, il faut utiliser les critères des sections 3.2.2 à 3.2.4;
- c) pour les effets corrosifs et irritants, il faut utiliser les critères des sections 3.2.5 et 3.2.6;
- d) pour les effets sensibilisants, il faut utiliser les critères de la section 3.2.7;
- e) pour les effets spécifiques sur la santé (effets cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction), il faut utiliser les critères du chapitre 4.

3.1.3. Pour les préparations, la classification relative au danger pour la santé s'effectue :

a) sur la base de la méthode conventionnelle visée à l'article 5 paragraphe 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993, en l'absence de données expérimentales. Dans ce cas, la classification se fonde sur les limites individuelles de concentration issues :

- soit de l'annexe I du présent arrêté,
- soit de l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances ne figurent pas dans l'annexe I du présent arrêté ou y figurent sans limites de concentration;
- b) ou, lorsque des données expérimentales sont disponibles, selon les critères décrits à la section 3.1.2, à l'exception des propriétés cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction visées à la section 3.1.2 point e), qui doivent être évaluées selon la méthode conventionnelle visée à l'article 5 paragraphe 5 points j) à q) de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Quelle que soit la méthode employée pour évaluer le danger d'une préparation, il y a lieu de tenir compte de tous les effets dangereux sur la santé tels qu'ils sont définis à l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993.

3.1.4. Lorsque la classification doit être établie à partir de résultats expérimentaux issus d'essais sur les animaux, les résultats doivent être validés pour l'homme, dans la mesure où ces essais révèlent, d'une manière appropriée, l'existence de risques pour l'homme.

3.1.5. La toxicité aiguë par voie orale de la substance ou de la préparation mise sur le marché peut être établie soit par une méthode permettant d'évaluer la valeur DL50, soit en déterminant la dose discriminante (méthode de la dose fixée).

La dose discriminante est la dose qui entraîne une toxicité manifeste mais pas de mortalité et doit être une des quatre doses précisées à l'annexe V (5, 50, 500 ou 2 000 mg/kg de poids corporel).

Le concept de « toxicité manifeste » s'emploie pour désigner les effets toxiques, après exposition à la substance testée, dont la sévérité est telle que l'exposition à la dose immédiatement supérieure entraînerait probablement la mort.

Les résultats de l'essai à une dose déterminée peuvent être :

- survie inférieure à 100 %,
- survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste,
- survie égale à 100 %, mais pas de toxicité manifeste.

La méthode d'essai requiert dans certains cas d'effectuer l'essai à des doses supérieures ou inférieures, s'il n'a pas déjà été pratiqué à la dose pertinente. Il convient de se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B1bis de l'annexe V.

Les critères des sections 3.2.1, 3.2.2 et 3.2.3 indiquent uniquement le résultat final de l'essai. Il y a lieu d'utiliser la dose de 2 000 mg/kg essentiellement pour obtenir des informations sur les effets toxiques des substances qui présentent une faible toxicité aiguë et qui ne sont pas classées sur la base de la toxicité aiguë.

3.2. Critères de classification, choix des symboles et indications de danger et choix des phrases indiquant les risques

3.2.1. Substances et préparations très toxiques

Les substances et préparations seront classées comme très toxiques et caractérisées par le symbole « T + » et l'indication de danger « très toxique » conformément aux critères spécifiés ci-après.

Les phrases indiquant les risques sont attribuées conformément aux critères suivants :

R28 Très toxique en cas d'ingestion

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie orale, rat : ≤ 25 mg/kg,
- survie inférieure à 100 % à 5 mg/kg par voie orale, rat (méthode de la dose fixée).

R27 Très toxique par contact avec la peau

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie cutanée, rat ou lapin : ≤ 50 mg/kg.

R26 Très toxique par inhalation

Toxicité aiguë :

- CL50 par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules : $\leq 0,25$ mg/l/4 h,
- CL50 par inhalation, rat, pour les gaz et les vapeurs : $\leq 0,5$ mg/l/4 h.

R39 Danger d'effets irréversibles très graves

Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au chapitre 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R39/26, R39/27, R39/28, R39/26/27, R39/26/28, R39/27/28, R39/26/27/28.

3.2.2. Substances et préparations toxiques

Les substances et préparations seront classées comme toxiques et caractérisées par le symbole « T » et l'indication « toxique » conformément aux critères spécifiés ci-après. Les phrases indiquant les risques seront attribuées selon les critères suivants :

R25 Toxique en cas d'ingestion

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie orale, rat : $25 < DL50 \leq 200$ mg/kg,
- dose discriminante par voie orale, rat, 5 mg/kg : survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste.

R24 Toxique par contact avec la peau

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie cutanée, rat ou lapin : $50 < DL50 \leq 400$ mg/kg.

R23 Toxique par inhalation

Toxicité aiguë :

- CL50 par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules : $0,25 < CL50 \leq 1$ mg/l/4 h,
- CL50 par inhalation, rat, pour les gaz et les vapeurs : $0,5 < CL50 \leq 2$ mg/l/4 h.

R39 Danger d'effets irréversibles très graves

Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au chapitre 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R39/23, R39/24, R39/25, R39/23/24, R39/23/25, R39/24/25, R39/23/24/25.

R48 Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée

— Des lésions graves (troubles fonctionnels ou modifications morphologiques ayant une importance toxicologique) peuvent résulter d'une exposition répétée ou prolongée, par une voie adéquate.

— Les substances et les préparations seront classées au moins comme toxiques lorsque ces effets sont observés à des doses sensiblement inférieures (c'est-à-dire dix fois) à celles fixées pour la phrase R48 à la section 3.2.3.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera une des phrases combinées suivantes : R48/23, R48/24, R48/25, R48/23/24, R48/23/25, R48/24/25, R48/23/24/25.

3.2.3. Substances et préparations nocives

Les substances et préparations seront classées comme nocives et caractérisées par le symbole « Xn » et l'indication de danger « nocif » conformément aux critères visés à l'annexe VI partie 1, comme spécifié ci-après. Les phrases indiquant les risques seront attribuées conformément aux critères suivants :

R22 Nocif en cas d'ingestion

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie orale, rat : $200 < DL50 \leq 2000$ mg/kg
- dose discriminante par voie orale, rat, 50 mg/kg : survie égale à 100 %, mais toxicité manifeste,

— survie inférieure à 100 % à 500 mg/kg par voie orale, rat (méthode de la dose fixée), se reporter au tableau d'évaluation de la méthode d'essai B1bis de l'annexe V.

R21 Nocif par contact avec la peau

Toxicité aiguë :

- DL50 par voie cutanée, rat ou lapin : $400 < DL50 \leq 2000$ mg/kg.

R20 Nocif par inhalation

Toxicité aiguë :

- CL50 par inhalation, rat, pour les aérosols ou les particules : $1 < CL50 \leq 5$ mg/l/4 h,
- CL50 par inhalation, rat, pour les gaz et les vapeurs : $2 < CL50 \leq 20$ mg/l/4 h.

R40 Possibilité d'effets irréversibles

Preuves très nettes de ce que des dommages irréversibles, différents des effets cités au chapitre 4, peuvent être provoqués par une seule exposition par une voie adéquate, généralement dans l'intervalle des valeurs précitées.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera également une des phrases combinées suivantes : R40/20, R40/21, R40/22, R40/20/21, R40/20/22, R40/21/22, R40/20/21/22.

R48 Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée

— Des lésions graves (troubles fonctionnels ou modifications morphologiques ayant une importance toxicologique) peuvent résulter d'une exposition répétée ou prolongée, par une voie adéquate.

— Les substances et les préparations seront classées au moins comme nocives lorsque ces effets sont observés à des doses de l'ordre de :

- voie orale, rat : ≤ 50 mg/kg (poids corporel)/jour,
- voie cutanée, rat ou lapin : ≤ 100 mg/kg (poids corporel)/jour,
- par inhalation, rat : $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/jour.

Ces valeurs indicatives peuvent s'appliquer directement lorsque des lésions graves ont été constatées au cours d'une étude de toxicité subchronique (90 jours). Pour l'interprétation des résultats d'une étude de toxicité subaiguë (28 jours), ces chiffres doivent être multipliés par trois environ. Si une étude de toxicité chronique (2 ans) est disponible, elle doit être examinée cas par cas. Si l'on dispose des résultats d'études de durées différentes, ceux de l'étude la plus longue doivent normalement être retenus.

Pour indiquer le mode d'administration/exposition, on utilisera également une des phrases combinées suivantes : R48/20, R48/21, R48/22, R48/20/21, R48/20/22, R48/21/22, R48/20/21/22.

3.2.3.1. Commentaires relatifs aux substances très volatiles

Pour certaines substances à concentration de vapeur saturante élevée, certains éléments peuvent indiquer des effets préoccupants. De telles substances peuvent ne pas être classées selon les critères relatifs aux effets sur la santé repris dans le présent guide (section 3.2.3). Cependant, lorsqu'il existe des preuves adéquates que ces substances peuvent présenter un risque lié à une manipulation et à une utilisation normales, la classification comme « nocif » avec une phrase adéquate peut être nécessaire au cas par cas.

Ces substances seront classées à l'annexe I avec des limites de concentration appropriées.

3.2.4. Commentaires relatifs à l'emploi de la phrase R48

L'emploi de cette phrase de risque fait référence à la gamme spécifique d'effets biologiques, dans les termes décrits ci-après. Pour l'application de cette phrase de risque, il faut considérer que les lésions graves pour la santé incluent la mort, les troubles fonctionnels évidents ou les modifications morphologiques significatives du point de vue toxicologique. Cela est important particulièrement lorsque ces modifications sont irréversibles. Il y a également lieu de considérer non seulement les modifications graves spécifiques à un seul organe ou système biologique, mais aussi les modifications généralisées présentant un caractère moins grave portant sur plusieurs organes ou les modifications graves de l'état de santé général.

Pour déterminer les preuves indiquant ces types d'effets, il y a lieu de se référer aux lignes directrices ci-après.

1. Preuves indiquant que la phrase R48 doit être appliquée :

- a) morts liées à la substance;
- b) (i) modifications fonctionnelles majeures du système nerveux central ou périphérique, y compris la vue, l'ouïe et l'odorat, déterminées par des observations cliniques ou d'autres méthodes appropriées (par exemple électrophysiologiques);
(ii) modifications fonctionnelles majeures d'un autre organe (par exemple les poumons);
- c) toute modification importante des paramètres de la biochimie clinique, de l'hématologie ou de l'analyse d'urine qui révèle un dysfonctionnement grave d'un organe. Les troubles hématologiques sont considérés comme particulièrement importants s'il apparaît qu'ils sont dus à la diminution de la production des globules par la moelle osseuse;
- d) dommages graves sur un organe, observés au microscope après autopsie :
(i) nécrose étendue ou grave, fibrose ou formation de granulomes dans les organes vitaux ayant une capacité régénératrice (par exemple le foie);
(ii) modifications morphologiques graves qui sont potentiellement réversibles mais qui indiquent clairement un dysfonctionnement organique prononcé (par exemple, infiltration graisseuse grave du foie, nécrose tubulaire aiguë grave du rein, gastrite ulcéraire);
(iii) mise en évidence d'une mortalité cellulaire importante dans des organes vitaux incapables de se régénérer (par exemple fibrose du myocarde ou dégénérescence rétrograde d'un nerf) ou dans les populations de cellules souches (par exemple, aplasie ou hypoplasie de la moelle osseuse).

Les preuves mentionnées ci-dessus seront la plupart du temps obtenues par des expériences sur des animaux. Lorsque l'on considère les données issues de l'expérience pratique, une attention particulière doit être accordée aux niveaux d'exposition.

2. Preuves indiquant que la phrase R48 ne doit pas être appliquée

L'emploi de cette phrase de risque est limité aux « lésions graves pour la santé en cas d'exposition prolongée ». Nombre d'effets liés aux substances pourraient être observés à la fois sur l'homme et sur l'animal, mais sans justifier l'emploi de la phrase R48. Ces effets ont de l'importance lorsque l'on tente de déterminer une dose sans effet pour une substance chimique. Les exemples de modifications bien établies qui ne justifieraient normalement pas une classification avec la phrase R48, sans tenir compte de leur signification, comprennent :

- a) les observations cliniques ou modifications de l'augmentation du poids corporel, de la consommation de nourriture ou d'eau qui peuvent avoir une certaine importance toxicologique mais n'indiquent pas, en tant que telles, des « lésions graves »;
- b) les légères modifications des paramètres de la biochimie clinique, de l'hématologie ou de l'analyse d'urine qui revêtent une importance toxicologique douteuse ou minime;
- c) les modifications de poids d'organes sans preuve de dysfonctionnement organique;
- d) les réactions adaptatives (par exemple migration des macrophages dans les poumons, hypertrophie du foie et induction enzymatique, réactions hyperplasiques aux substances irritantes); les effets locaux sur la peau produits par une application cutanée répétée d'une substance, qui seraient normalement mieux caractérisés par la phrase R38 « irritant pour la peau »;
- e) lorsque l'on a démontré un mécanisme de toxicité spécifique de l'espèce animale (par exemple, par des voies métaboliques spécifiques).

3.2.5. Substances et préparations corrosives

Une substance ou une préparation est considérée comme corrosive si, lorsqu'elle est appliquée sur la peau saine et intacte d'un animal, elle produit des destructions tissulaires sur toute la profondeur de la peau, chez un animal au moins, au cours des essais d'irritation cutanée cités à l'annexe V ou au cours d'une méthode équivalente ou si le résultat peut être prédit, par exemple : réactions fortement acides ou alcalines (pH égal ou inférieur à 2 ou égal ou supérieur à 11,5). Il convient de tenir également compte de la réserve alcaline ou acide.

La classification peut se baser sur les résultats d'essais *in vitro* validés.

La substance ou préparation sera classée comme corrosive et caractérisée par le symbole « C » et par l'indication de danger « corrosif ». Les phrases indiquant les risques seront attribuées conformément aux critères suivants :

R35 Provoque de graves brûlures

Si, lorsqu'elle est appliquée sur la peau saine et intacte d'un animal, des destructions tissulaires apparaissent sur toute la profondeur de la peau après un temps d'exposition ne dépassant pas trois minutes ou si tel résultat est prévisible.

R34 Provoque des brûlures

— Si, lorsqu'elle est appliquée sur la peau saine et intacte d'un animal, des destructions tissulaires apparaissent sur toute la profondeur de la peau après un temps d'exposition ne dépassant pas quatre heures ou si un tel résultat est prévisible.

— Hydroperoxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

3.2.6. Substances et préparations irritantes

Les substances et préparations non corrosives seront classées comme irritantes, caractérisées par le symbole « Xi » et l'indication de danger « irritant » conformément aux critères mentionnés ci-après.

3.2.6.1. Inflammation de la peau

La phrase de risque suivante sera attribuée conformément aux critères donnés :

R38 Irritant pour la peau

— Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau, présente pendant au moins 24 heures après une période d'exposition ne dépassant pas 4 heures, déterminée chez le lapin conformément à la méthode d'essai d'irritation cutanée citée à l'annexe V.

L'inflammation de la peau est importante si :

— la valeur moyenne des scores, pour l'ensemble des animaux d'essai, en ce qui concerne la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème est égale ou supérieure à 2,

— ou bien, si l'essai visé à l'annexe V a été réalisé sur trois animaux, lorsque l'on a constaté la formation d'érythème et d'escarre ou la formation d'œdème équivalant à une valeur moyenne égale ou supérieure à 2 pour chaque animal, chez deux animaux au moins.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48, 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

L'inflammation de la peau est également importante si elle persiste sur au moins deux animaux à la fin de la période d'observation. Il convient de tenir compte des effets particuliers, par exemple hyperplasie, desquamation, décoloration, fissures, escarres et alopecie.

— Substances et préparations qui provoquent une inflammation importante de la peau, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

— Peroxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

Irritation due aux propriétés dégraissantes d'une substance :

Lorsque des résultats d'essai ou la pratique montrent une irritation conformément aux critères précités, il y a lieu d'utiliser des phrases indiquant les risques. Toutefois, lorsqu'il existe des raisons de croire que les propriétés dégraissantes de la substance peuvent causer une irritation chez l'homme, il convient d'utiliser des conseils de prudence même si les critères précités ne sont pas remplis ou si un essai inadéquat a été utilisé.

3.2.6.2. Lésion oculaire

Les phrases de risque suivantes seront aussi attribuées conformément aux critères donnés :

R36 Irritant pour les yeux

— Substances et préparations qui, en cas d'application sur l'œil de l'animal, provoquent des lésions oculaires importantes qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Les lésions oculaires sont considérées comme importantes si la moyenne des scores de l'essai visé à l'annexe V a une des valeurs suivantes :

— opacité cornéenne égale ou supérieure à 2 mais inférieure à 3,

— lésion de l'iris égale ou supérieure à 1, inférieure ou égale à 1,5,

— rougeur de la conjonctive égale ou supérieure à 2,5,

— œdème de la conjonctive (chémosis) égal ou supérieur à 2,

ou bien si l'essai visé à l'annexe V a été réalisé sur trois animaux, lorsque les lésions sur au moins deux animaux sont équivalentes à l'une des valeurs précitées, sauf pour la lésion de l'iris où la valeur devra être égale ou supérieure à I mais inférieure à 2 et la rougeur de la conjonctive où la valeur devra être égale ou supérieure à 2,5.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48, 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

— Substances et préparations qui provoquent des lésions oculaires importantes, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

— Peroxydes organiques, sauf s'il existe des preuves du contraire.

R41 Risque de lésions oculaires graves

— Substances et préparations qui, en cas d'application sur l'œil de l'animal, provoquent des lésions oculaires graves qui surviennent au cours des 72 heures suivant l'instillation et persistent 24 heures au moins.

Les lésions oculaires doivent être considérées comme graves si la moyenne des scores de l'essai d'irritation de l'œil visé à l'annexe V a une des valeurs suivantes :

— opacité cornéenne égale ou supérieure à 3,

— lésion de l'iris supérieure à 1,5.

Il en est de même si l'essai a été effectué sur trois animaux, lorsque ces lésions sur au moins deux animaux sont équivalentes à l'une des valeurs ci-après :

- opacité cornéenne égale ou supérieure à 3,
- lésion de l'iris égale à 2.

Dans les deux cas, il convient d'utiliser tous les scores obtenus à chaque lecture d'un effet (24, 48, 72 heures) pour calculer les valeurs moyennes respectives.

Les lésions oculaires sont également graves lorsqu'elles persistent à la fin de la période d'observation.

Les lésions oculaires sont également graves si la substance ou préparation provoque une coloration irréversible des yeux.

— Substances et préparations qui provoquent de graves lésions oculaires, sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

Remarque :

Lorsqu'une substance ou préparation est classée comme corrosive avec les phrases R34 ou R35, le risque de lésions oculaires graves est considéré comme implicite et la phrase R41 n'est pas mentionnée sur l'étiquette. Toutefois, dans le cas des préparations, lorsque l'on calcule la somme des quotients selon les formules figurant à l'article 5, § 5 points f) sous ii) et h) sous ii) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993, les substances classées comme corrosives devront être considérées comme si la phrase R41 leur avait été attribuée.

3.2.6.3. Irritation du système respiratoire

La phrase de risque suivante sera attribuée conformément aux critères donnés :

R37 Irritant pour les voies respiratoires

— Substances et préparations qui causent une irritation grave du système respiratoire, normalement sur la base d'observations pratiques chez l'homme.

3.2.7. Substances et préparations sensibilisantes

3.2.7.1. Sensibilisation par inhalation

Les substances et préparations seront classées comme sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xn », l'indication de danger « nocif » et la phrase de risque R42, conformément aux critères mentionnés ci-dessous.

R42 Peut entraîner une sensibilisation par inhalation

— Si des observations pratiques montrent que ces substances et préparations peuvent entraîner chez l'homme une réaction de sensibilisation par inhalation d'une fréquence supérieure à celle escomptée dans une population normale.

— Si la substance est un isocyanate, sauf s'il existe des preuves que la substance ne provoque pas de sensibilisation par inhalation.

3.2.7.2. Sensibilisation par contact avec la peau

Les substances et préparations seront classées comme sensibilisantes et caractérisées par le symbole « Xi », l'indication de danger « irritant » et la phrase de risque R43, conformément aux critères donnés ci-dessous.

R43 Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau

Si l'expérience montre que les substances et préparations peuvent provoquer une réaction de sensibilisation par contact avec la peau chez un nombre significatif de personnes ou si des expériences réalisées sur l'animal donnent un résultat positif.

Dans le cas de la méthode d'essai pour la sensibilisation de la peau décrite à l'annexe V ou dans le cas d'autres méthodes d'essai type adjuvant, on considère comme positive une réponse sur au moins 30 % des animaux. Dans le cas de toute autre méthode d'essai, on considère comme positive une réponse sur au moins 15 % des animaux.

3.2.7.3. Il faut remarquer que si le symbole « Xn » et l'indication de danger « nocif » sont attribués, le symbole « Xi » et l'indication de danger « irritant » sont facultatifs.

3.2.8. Autres propriétés toxicologiques

Des phrases complémentaires indiquant les risques seront attribuées aux substances et préparations classées conformément aux sections 2.2.1 à 3.2.7 ci-dessus et/ou aux chapitres 4 et 5, compte tenu des critères suivants (sur la base de l'expérience acquise lors de l'élaboration de l'annexe I) :

R29 Au contact de l'eau, dégage des gaz toxiques

Substances et préparations qui, au contact de l'eau ou de l'air humide, dégagent des gaz très toxiques/toxiques en quantités potentiellement dangereuses; par exemple le phosphore d'aluminium, le pentasulfure de phosphore.

R31 Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz toxiques en quantités dangereuses; par exemple l'hypochlorite de sodium, le polysulfure de baryum. En ce qui concerne les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S50 : « Ne pas mélanger avec... (à préciser par le fabricant) ».

R32 Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique

Substances et préparations qui réagissent avec des acides en dégageant des gaz très toxiques en quantités dangereuses; par exemple les sels de l'acide cyanhydrique, l'azoture de sodium. Pour les substances utilisées par le grand public, il serait préférable d'utiliser la phrase S50 : « Ne pas mélanger avec... (à préciser par le fabricant) ».

R33 Danger d'effets cumulatifs

Substances et préparations susceptibles de s'accumuler dans le corps humain et pouvant ainsi donner lieu à une certaine inquiétude, sans toutefois que cette accumulation soit telle qu'elle justifie l'utilisation de la phrase R48.

R64 Risque possible pour les bébés nourris au lait maternel

Pour les substances et préparations qui, absorbées par des femmes, peuvent perturber l'allaitement ou qui peuvent être présentes (y compris sous forme de métabolites) dans le lait maternel en quantités suffisantes pour être préoccupantes pour la santé d'un enfant nourri au sein.

Pour les commentaires relatifs à l'emploi de cette phrase R (et dans certains cas de la phrase R33), voir la section 4.2.3.3.

Pour les autres phrases complémentaires de risque, voir la section 2.2.6.

4. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SPÉCIFIQUES SUR LA SANTÉ

4.1. Introduction

4.1.1. Procédure de classification des substances susceptibles d'avoir les effets décrits dans le présent chapitre

4.1.2. Si un fabricant ou son représentant dispose d'informations indiquant qu'une substance devrait être classée et étiquetée conformément aux critères énoncés aux sections 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3, il doit étiqueter provisoirement la substance conformément à ces critères, sauf si les conclusions tirées de l'application des critères mentionnés aux sections 3.2.1 à 3.2.5 montrent qu'une classification plus sévère s'impose.

4.1.3. Il est demandé au fabricant ou à son représentant de remettre dans les plus brefs délais à un des États membres où la substance est commercialisée un document résumant toutes les informations intéressant cette substance. Ce résumé doit comporter une bibliographie contenant toutes les références pertinentes et peut comprendre toute information intéressante non publiée.

4.1.4. En outre, un fabricant ou son représentant disposant de nouvelles informations intéressant la classification et l'étiquetage d'une substance conformément aux critères cités aux sections 4.2.1, 4.2.2 ou 4.2.3 doit remettre lesdites informations à un des États membres où la substance est commercialisée.

4.1.5. En vue d'aboutir le plus rapidement possible à une classification uniforme dans la Communauté Européenne par la procédure prévue à l'article 28 de la directive 67/548/CEE, les États membres disposant d'informations justifiant la classification d'une substance dans une de ces catégories, que ces informations aient été fournies ou non par le fabricant, doivent envoyer dans les meilleurs délais à la Commission Européenne les dites informations, accompagnées de propositions de classification et d'étiquetage.

La Commission enverra aux autres États membres la proposition de classification et d'étiquetage qu'elle a reçue. Tout État membre peut demander à la Commission Européenne la communication des informations qu'elle a reçues.

Tout État membre qui, pour des raisons précises, estime inappropriés la classification et l'étiquetage suggérés en ce qui concerne les effets cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction, le fait savoir à la Commission.

4.2. Critères de classification, indication de danger et choix des phrases indiquant les risques

4.2.1. Substances cancérigènes

En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories.

Première catégorie

Substances que l'on sait être cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et l'apparition d'un cancer.

Deuxième catégorie

Substances devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut provoquer un cancer. Cette présomption est généralement fondée sur :

- des études appropriées à long terme sur l'animal,
- d'autres informations appropriées.

Troisième catégorie

Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles, mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante. Il existe des informations issues d'études adéquates sur les animaux, mais elles sont insuffisantes pour classer la substance dans la deuxième catégorie.

4.2.1.1. Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.

Première et deuxième catégories

T; R45 Peut provoquer le cancer

Toutefois, pour les substances et préparations qui présentent un risque cancérigène uniquement par inhalation, par exemple les poussières, les vapeurs, les fumées (l'exposition par les autres voies, par exemple par ingestion ou par contact avec la peau, ne présentant aucun risque cancérigène), il convient d'utiliser le symbole et la phrase indiquant les risques particuliers ci-après.

T; R49 Peut provoquer le cancer par inhalation

Troisième catégorie

Xn; R40 Possibilité d'effets irréversibles

4.2.1.2. Commentaires relatifs à la catégorisation des substances cancérigènes

L'introduction d'une substance dans la première catégorie repose sur des données épidémiologiques; l'introduction dans les deuxième et troisième catégories s'effectue essentiellement à partir de résultats expérimentaux sur des animaux.

Pour la classification comme substance cancérigène de la deuxième catégorie, il faut disposer soit de résultats positifs pour deux espèces animales, soit d'éléments positifs indiscutables pour une espèce, étayés par des éléments secondaires tels que des données sur la génotoxicité, des études métaboliques ou biochimiques, l'induction de tumeurs bénignes, les relations structurelles avec d'autres substances cancérigènes connues ou des données tirées d'études épidémiologiques suggérant une association.

La troisième catégorie comprend en réalité deux sous-catégories :

a) substances suffisamment étudiées, mais pour lesquelles il n'existe pas d'effets tumorigènes suffisants pour entraîner le classement dans la deuxième catégorie. Par ailleurs, des expériences complémentaires ne seraient pas susceptibles d'apporter d'autres informations pertinentes pour la classification;

b) substances insuffisamment étudiées. Les données disponibles sont inadéquates mais sont préoccupantes pour l'homme. Cette classification est provisoire; des expériences complémentaires sont nécessaires avant de prendre la décision finale.

Pour opérer une distinction entre les deuxième et troisième catégories, sont considérés comme pertinents les arguments ci-après qui réduisent le caractère significatif de l'induction expérimentale d'une tumeur en ce qui concerne une exposition éventuelle de l'homme. Ces arguments, surtout associés, aboutiraient dans la plupart des cas à une classification dans la troisième catégorie, même si des tumeurs ont été induites chez des animaux :

- effets cancérogènes uniquement à très fortes doses excédant la « dose maximale tolérée ». La dose maximale tolérée se caractérise par des effets toxiques qui, même s'ils ne modifient pas encore la durée de vie, s'accompagnent de modifications physiques telles qu'un retard de 10 % environ du gain de poids,
- apparition de tumeurs, surtout à fortes doses, uniquement dans des organes particuliers de certaines espèces connues pour leur propension à la formation d'un nombre important de tumeurs spontanées,
- apparition de tumeurs, uniquement au site d'application, dans des systèmes d'essai très sensibles (par exemple l'application intrapéritonéale ou sous-cutanée de certains composés actifs localement), si cette cible particulière n'est pas applicable à l'homme,
- absence de génotoxicité lors des essais à court terme *in vivo* et *in vitro*,
- existence d'un mécanisme secondaire d'action n'apparaissant qu'à partir d'un certain seuil (par exemple les effets hormonaux sur des organes cibles ou sur des mécanismes de régulation physiologique, la stimulation chronique de la prolifération des cellules),
- existence d'un mécanisme spécifique de l'espèce pour la formation de tumeurs (par exemple, par des voies métaboliques spécifiques), non applicable à l'homme.

Pour effectuer une distinction entre une classification dans la troisième catégorie et aucune classification, sont considérés comme pertinents les arguments excluant une préoccupation pour l'homme :

- une substance ne doit être classée dans aucune des catégories si le mécanisme de formation expérimentale de tumeurs est clairement identifié, avec des éléments indiquant clairement que ce processus ne peut être extrapolé à l'homme,
- si les seules données disponibles sur les tumeurs concernent des tumeurs du foie sur certaines souches de souris, sans autre indication complémentaire, la substance peut n'être classée dans aucune des catégories précitées,
- il faut accorder une attention particulière aux cas pour lesquels les seules données disponibles sur les tumeurs concernent l'apparition de néoplasmes sur des sites et des souches où il est bien connu qu'ils apparaissent spontanément avec une incidence élevée.

4.2.2. Substances mutagènes

4.2.2.1. En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories.

Première catégorie

Substances que l'on sait être mutagènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et des défauts génétiques héréditaires.

Deuxième catégorie

Substances devant être assimilées à des substances mutagènes pour l'homme.

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut entraîner des défauts génétiques héréditaires. Cette présomption est généralement fondée sur :

- des études appropriées sur l'animal,
- d'autres informations appropriées.

Troisième catégorie

Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets mutagènes possibles. Des études appropriées de mutagénicité ont fourni des éléments, mais ils sont insuffisants pour classer ces substances dans la deuxième catégorie.

4.2.2.2. Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.

Première catégorie

T; R46 Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires

Deuxième catégorie

T; R46 Peut provoquer des altérations génétiques héréditaires

Troisième catégorie

Xn; R40 Possibilité d'effets irréversibles

4.2.2.3. Commentaires relatifs à la catégorisation des substances mutagènes

Définition des termes

Une mutation est une modification permanente du nombre ou de la structure du matériel génétique dans un organisme, qui aboutit à une modification des caractéristiques phénotypiques de l'organisme. Les altérations peuvent impliquer un gène unique, un ensemble de gènes ou un chromosome entier. Les effets concernant des gènes uniques peuvent résulter d'effets sur une seule des bases d'ADN (acide désoxyribonucléique) (mutations ponctuelles) ou de profondes modifications, y compris des délétions, au sein du gène. Les effets sur des chromosomes entiers peuvent entraîner des modifications structurelles ou numériques. Une mutation des cellules germinales dans les organismes à reproduction sexuée peut être transmise à la descendance. Un mutagène est un agent qui augmente l'apparition de mutations.

Il faut remarquer que les substances sont classées comme mutagènes en se référant spécifiquement aux défauts génétiques héréditaires. Toutefois, le type de résultats menant à une classification des produits chimiques dans la troisième catégorie, « induction d'événements génétiquement importants dans les cellules somatiques », est généralement aussi considéré comme une alerte pour une éventuelle activité cancérogène.

La mise au point des méthodes d'essai de la mutagénicité est en constant développement. Pour de nombreux nouveaux essais, il n'existe ni protocoles normalisés, ni critères d'évaluation. Pour évaluer les données de mutagénicité, il faut considérer la qualité de l'exécution de l'essai et le taux de validation de la méthode d'essai.

Première catégorie

Pour classer une substance dans la première catégorie, la mise en évidence de mutations chez l'homme, issue d'études épidémiologiques sur la mutation humaine, sera nécessaire. Des exemples de telles substances sont inconnus à ce jour. On reconnaît qu'il est difficile d'obtenir des données fiables à partir d'études sur l'incidence des mutations dans des populations humaines ou sur les augmentations possibles de leurs fréquences.

Deuxième catégorie

Pour classer une substance dans la deuxième catégorie, il faut détenir des résultats positifs tirés d'études montrant : a) des effets mutagènes ou b) d'autres interactions cellulaires significatives pour la mutagénicité, dans les cellules germinales de mammifères *in vivo*, ou c) des effets mutagènes dans les cellules somatiques de mammifères *in vivo*, accompagnés d'éléments irréfutables indiquant que la substance, ou un métabolite significatif, atteint les cellules germinales.

En ce qui concerne la classification dans la deuxième catégorie, on considère actuellement comme appropriées les méthodes ci-après.

2 (a) Essais de mutagénicité *in vivo* sur cellules germinales :

- essai de mutation d'un locus spécifique,
- essai de translocation héréditaire,
- essai de mutation létale dominante.

Ces essais démontrent vraiment l'existence d'une atteinte de la descendance ou d'un défaut de développement de l'embryon.

2 (b) Essais *in vivo* montrant une interaction pertinente avec les cellules germinales (habituellement l'ADN) :

- essais d'anomalies chromosomiques, telles que détectées par analyse cytogénétique, y compris l'aneuploïdie, provoquée par une mauvaise ségrégation chromosomique,
- essais d'échanges de chromatides sœurs,
- essais de synthèse non programmée de l'ADN,
- essai de liaison (covalente) du mutagène à l'ADN de la cellule germinale,
- essai d'autres types de défauts de l'ADN.

Ces essais fournissent des preuves plus ou moins indirectes. Leurs résultats positifs doivent normalement être étayés par des résultats positifs tirés d'essais *in vivo* de mutagénicité sur cellules somatiques, chez des mammifères ou chez l'homme [voir sous 3, de préférence des méthodes telles que sous 3(a)].

2 (c) Essais *in vivo* montrant des effets mutagènes dans les cellules somatiques de mammifères [voir sous 3 (a)], en combinaison avec des méthodes toxicocinétiques ou d'autres méthodologies pouvant démontrer que le composé ou un métabolite significatif atteint les cellules germinales.

Pour les méthodes 2 (b) et 2 (c), des résultats positifs d'essais avec hôte intermédiaire (*host-mediated*) ou la démonstration d'effets irréfutables lors d'essais *in vitro* peuvent être considérés comme preuves supplémentaires.

Troisième catégorie

Pour classer une substance dans la troisième catégorie, il faut détenir des résultats positifs tirés d'essais montrant : a) des effets mutagènes ou b) une autre interaction cellulaire en rapport avec la mutagénicité, dans les cellules somatiques de mammifères *in vivo*. Cette dernière surtout doit normalement être étayée par des résultats positifs tirés d'essais de mutagénicité réalisés *in vitro*.

En ce qui concerne les effets dans les cellules somatiques *in vivo*, on considère actuellement comme appropriées les méthodes ci-après.

3 (a) Essais *in vivo* de mutagénicité sur des cellules somatiques :

- essais du micronoyau sur cellule de moelle osseuse ou analyse des métaphases,
- analyse des métaphases de lymphocytes périphériques,
- essai de taches colorées sur le pelage de souris (*spot-test*).

3 (b) Essais *in vivo* d'interaction avec l'ADN de cellules somatiques :

- essai d'échanges de chromatides sœurs dans des cellules somatiques,
- essai de synthèse non programmée de l'ADN dans des cellules somatiques,
- essai de liaison (covalente) du mutagène à l'ADN de la cellule somatique,
- essai de défauts de l'ADN, par exemple par élution alcaline, dans des cellules somatiques.

Les substances montrant des résultats positifs uniquement dans un ou plusieurs essais de mutagénicité *in vitro* ne doivent normalement pas être classées. Toutefois, leur étude complémentaire par des essais *in vivo* est vivement conseillée. Dans des cas exceptionnels, il faut envisager une classification dans la troisième catégorie, par exemple pour une substance qui présente des réponses prononcées dans plusieurs essais *in vitro*, pour laquelle on ne dispose d'aucune information pertinente *in vivo* et qui présente une ressemblance avec des substances mutagènes/cancérogènes connus.

4.2.3. Substances toxiques pour la reproduction

4.2.3.1. En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et vu l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en trois catégories.

Première catégorie

Substances connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine

On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à la substance et une altération de la fertilité.

Substances connues pour provoquer des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine

On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition humaine à la substance et des effets toxiques ultérieurs sur le développement de la descendance.

Deuxième catégorie

Substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut altérer la fertilité. Cette présomption se fonde sur :

- la mise en évidence nette, dans des études sur l'animal, d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effets toxiques, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques,
- d'autres informations pertinentes.

Substances devant être assimilées à des substances causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine

On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition humaine à de telles substances peut entraîner des effets toxiques sur le développement. Cette présomption se fonde généralement sur :

- la mise en évidence nette, dans des études appropriées sur l'animal, d'effets observés soit en l'absence de signes de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui ne sont pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques,
- d'autres informations pertinentes.

Troisième catégorie

Substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine

Généralement sur la base :

- de résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion d'une altération de la fertilité intervenant soit en l'absence d'effets toxiques, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques, ces preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance dans la deuxième catégorie,
- d'autres informations pertinentes.

Substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement

Généralement sur la base :

- de résultats d'études appropriées sur l'animal qui fournissent suffisamment d'éléments pour entraîner une forte suspicion de toxicité pour le développement soit en l'absence de signes de toxicité maternelle marquée, soit à des niveaux de doses proches des doses toxiques, mais qui n'est pas un effet non spécifique secondaire aux effets toxiques, les preuves étant toutefois insuffisantes pour classer la substance dans la deuxième catégorie,
- d'autres informations pertinentes.

4.2.3.2. Les symboles et phrases indiquant les risques particuliers ci-après s'appliquent.

Première catégorie

Pour les substances qui altèrent la fertilité dans l'espèce humaine :

T; R60 Peut altérer la fertilité

Pour les substances provoquant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine :

T; R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

Deuxième catégorie

Pour les substances devant être assimilées à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine :

T; R60 Peut altérer la fertilité

Pour les substances devant être assimilées à des substances provoquant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine :

T; R61 Risque pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

Troisième catégorie

Pour les substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine :

Xn; R62 Risque possible d'altération de la fertilité

Pour les substances préoccupantes pour l'homme eu égard à des effets toxiques possibles sur le développement :

Xn; R63 Risque possible pendant la grossesse d'effets néfastes pour l'enfant

4.2.3.3. *Commentaires relatifs à la catégorisation des substances toxiques pour la reproduction*

La toxicité pour la reproduction comprend l'altération des fonctions ou de la capacité de reproduction chez l'homme ou la femme et l'induction d'effets néfastes non héréditaires sur la descendance. Elle peut être classée sous deux rubriques principales, à savoir : 1) effets sur la fertilité masculine ou féminine, 2) toxicité pour le développement.

1) *Effets sur la fertilité masculine ou féminine*

Cette catégorie comprend les effets néfastes sur la libido, le comportement sexuel, les différents aspects de la spermatogenèse ou de l'oogénèse ou sur l'activité hormonale ou la réponse physiologique qui perturberaient la capacité de fécondation, la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé jusqu'à et y compris l'implantation.

2) *Toxicité pour le développement*

Elle est considérée dans son sens le plus large, y compris tout effet perturbant le développement normal, aussi bien avant qu'après la naissance. Elle englobe tant les effets qui sont induits ou se manifestent avant la naissance que ceux qui se manifestent après la naissance. Cela comprend les effets embryotoxiques/foetotoxiques tels que la réduction du poids corporel, le retard de croissance et de développement, la toxicité pour les organes, la mort, l'avortement, les anomalies structurelles (effets tératogènes), les anomalies fonctionnelles, les anomalies péri- ou postnatales ainsi que l'altération du développement mental ou physique après la naissance, jusqu'à et y compris le développement pubertaire normal.

La classification des produits chimiques comme toxiques pour la reproduction est destinée à être utilisée pour les produits chimiques qui présentent une propriété intrinsèque ou spécifique de produire de tels effets toxiques. Il n'y a pas lieu de classer les produits chimiques comme toxiques pour la reproduction si ces effets interviennent uniquement en tant que conséquence secondaire non spécifique d'autres effets toxiques. Les produits chimiques les plus préoccupants sont ceux qui sont toxiques pour la reproduction à des niveaux d'exposition qui ne donnent pas d'autres signes de toxicité.

La classification d'une substance dans la première catégorie pour les effets sur la fertilité et/ou la toxicité pour le développement repose sur des données épidémiologiques. La classification dans les deuxième et troisième catégories s'effectue essentiellement à partir de données animales. Les données d'études *in vitro*, ou d'études sur des œufs aviens, sont considérées comme des « preuves complémentaires » et ne pourraient qu'exceptionnellement autoriser une classification en l'absence de données *in vivo*.

Comme la plupart des autres types d'effet toxique, il est vraisemblable que les substances manifestant une toxicité pour la reproduction auront un seuil sous lequel les effets néfastes ne seraient pas démontrés. Même lorsque des effets nets ont été démontrés dans des études sur l'animal, l'extrapolation à l'homme peut être incertaine du fait des doses administrées, par exemple lorsque des effets se sont manifestés uniquement à des doses élevées, que les toxicocinétiques sont nettement différentes ou que la voie d'administration est inadéquate. Pour ces raisons ou d'autres raisons analogues, il se peut que la classification dans la troisième catégorie, voire l'absence de classification, soit justifiée.

L'annexe V du présent arrêté prévoit un essai de limite dans le cas des substances de faible toxicité. Si une dose d'au moins 1000 mg/kg par voie orale ne produit aucun signe de toxicité pour la reproduction, les études à d'autres doses peuvent être considérées comme inutiles. S'il existe des données d'études effectuées à des doses supérieures à la dose limite précitée, ces données doivent être prises en compte avec les autres informations pertinentes. Dans des circonstances normales, on considère que les effets constatés uniquement à des doses supérieures à la dose limite n'entraînent pas nécessairement une classification comme toxique pour la reproduction.

EFFETS SUR LA FERTILITE

Pour la classification d'une substance dans la deuxième catégorie en raison d'une altération de la fertilité, il doit normalement exister des preuves manifestes sur une espèce animale, accompagnées de preuves complémentaires sur le mécanisme ou le site d'action, ou sur l'existence d'une analogie chimique avec d'autres agents d'« antifertilité » connus, ou d'autres informations chez l'homme qui permettent de conclure que des effets seraient susceptibles d'être observés chez l'homme. Lorsqu'il existe des études sur une seule espèce, sans autres preuves complémentaires appropriées, la classification dans la troisième catégorie peut alors s'avérer adéquate.

Étant donné que l'altération de la fertilité peut survenir de façon non spécifique et secondairement à une toxicité générale sévère ou en cas d'inanition grave, la classification dans la deuxième catégorie doit uniquement s'effectuer lorsqu'il est prouvé qu'il existe un certain degré de spécificité de la toxicité pour le système reproducteur. S'il a été démontré dans des études sur l'animal que l'altération de la fertilité était due à un échec de l'accouplement, la classification dans la deuxième catégorie requiert normalement la mise en évidence du mécanisme d'action afin de déterminer si un effet adverse tel qu'une altération du schéma de production hormonale est susceptible de se produire dans l'espèce humaine.

TOXICITE POUR LE DEVELOPPEMENT

Pour la classification dans la deuxième catégorie, il doit exister des preuves manifestes d'effets néfastes dans des études correctement menées sur une ou plusieurs espèces. Comme les effets néfastes survenus pendant la grossesse ou en période postnatale peuvent être une conséquence secondaire de la toxicité pour la mère, d'une absorption réduite de nourriture ou d'eau, du stress maternel, du manque de soins maternels, de déficits alimentaires spécifiques, de conditions d'élevage médiocres, d'infections intercurrentes, etc., il importe que les effets observés interviennent dans des études correctement menées et à des doses non associées à une toxicité maternelle marquée. La voie d'exposition est également importante. En particulier, l'injection intrapéritonéale de substance irritante peut provoquer des lésions locales de l'utérus et de son contenu, et les résultats de telles études doivent être interprétés avec prudence et n'entraînent normalement pas à eux seuls une classification.

La classification dans la troisième catégorie se fonde sur des critères similaires à ceux de la deuxième catégorie, mais elle peut être utilisée lorsque le protocole expérimental présente des défauts qui rendent les conclusions moins convaincantes, ou lorsqu'il est impossible d'exclure que les effets puissent être dus à des facteurs non spécifiques tels qu'une toxicité générale.

En général, la classification dans la troisième catégorie ou la non-classification serait attribuée sur une base *ad hoc* lorsque les seuls effets enregistrés sont des modifications réduites de l'incidence des défauts spontanés, des proportions des variations courantes observées dans les examens du squelette, ou des différences réduites dans l'appréciation du développement postnatal.

Effets durant la lactation

Les substances classées toxiques pour la reproduction sont également préoccupantes en raison de leurs effets sur la lactation; elles doivent également être étiquetées avec la phrase R64 (voir les critères à la section 3.2.8).

En ce qui concerne la classification, les effets toxiques sur la descendance résultant *uniquement* de l'exposition via le lait maternel ou les effets toxiques résultant de l'exposition *directe* des enfants ne seront pas considérés comme « toxiques pour la reproduction », sauf si ces effets entraînent une altération du développement de la descendance.

Les substances non classées toxiques pour la reproduction, mais préoccupantes en raison de leur toxicité une fois transmises au nourrisson au cours de la période d'allaitement, doivent être étiquetées avec la phrase R64 (voir les critères à la section 3.2.8). Cette phrase R peut également s'avérer appropriée pour les substances qui affectent la quantité ou la qualité du lait.

La phrase R64 doit normalement être attribuée sur la base :

- d'études toxicocinétiques qui indiquent la présence probable dans le lait de la substance à des niveaux potentiellement toxiques
et/ou
 - sur la base de résultats d'étude(s) sur une ou deux générations chez l'animal, qui indiquent la présence d'effets néfastes sur la descendance en raison du passage dans le lait,
et/ou
 - sur la base de preuves chez l'homme indiquant un risque pour les nourrissons pendant la période d'allaitement.
- Les substances dont on sait qu'elles s'accumulent dans l'organisme et pourraient être ensuite libérées dans le lait au cours de la lactation peuvent être étiquetées avec les phrases R33 et R64.

4.2.4. Procédure de classification des préparations en ce qui concerne les effets spécifiques sur la santé

Si une préparation contient une ou plusieurs substances classées en fonction des critères détaillés ci-dessus, elle doit être classée conformément aux critères visés à l'article 5 paragraphe 5 points j) à q) de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 (les limites de concentration se trouvent soit à l'annexe I du présent arrêté, soit à l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993 lorsque la ou les substances considérées ne figurent pas à l'annexe I ou y figurent sans limites de concentration).

5. CLASSIFICATION SUR LA BASE DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT

5.1. Introduction

La classification des substances dangereuses pour l'environnement vise principalement à avertir l'utilisateur des risques que ces substances présentent pour les écosystèmes. Même si les critères actuels se réfèrent largement aux écosystèmes aquatiques, il est reconnu que certaines substances peuvent simultanément ou alternativement affecter d'autres écosystèmes dont les éléments peuvent aller de la microflore et de la microfaune du sol aux primates.

Les critères indiqués ci-après proviennent directement des méthodes d'essai citées à l'annexe V dans la mesure où elles sont mentionnées. Les méthodes d'essai requises pour le « dossier de base », citées à l'annexe VII, sont limitées et les informations qui en sont dérivées peuvent se révéler insuffisantes pour établir une classification appropriée. La classification peut exiger des données complémentaires provenant du niveau I (annexe VIII) ou d'autres études équivalentes. En outre, les substances classées peuvent faire l'objet d'une révision à la lumière de données nouvelles.

En ce qui concerne la classification et l'étiquetage, et eu égard à l'état actuel des connaissances, ces substances sont divisées en deux groupes, soit en fonction de leurs effets aigus et/ou à long terme dans les systèmes aquatiques, soit en fonction de leurs effets aigus et/ou à long terme dans les systèmes non aquatiques.

5.2. Critères de classification, indication de danger et choix des phrases indiquant les risques

5.2.1. Environnement aquatique

5.2.1.1. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole « N », l'indication de danger appropriée et des phrases indiquant les risques compte tenu des critères suivants :

R50 Très toxique pour les organismes aquatiques

et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë : 96 h CL₅₀ (poisson) : ≤ 1 mg/l
 ou 48 h CE₅₀ (daphnie) : ≤ 1 mg/l
 ou 72 h CI₅₀ (algues) : ≤ 1 mg/l

et la substance ne se dégrade pas facilement,
ou le log P_{OE} (expression logarithmique du coefficient de partage octanol/eau) ≥ 3,0 (sauf si le BCF déterminé expérimentalement ≤ 100)

(BCF= *bioconcentration factor*; coefficient de bioconcentration).

R50 Très toxique pour les organismes aquatiques

Toxicité aiguë : 96 h CL₅₀ (poisson) : ≤ 1 mg/l
 ou 48 h CE₅₀ (daphnie) : ≤ 1 mg/l
 ou 72 h CI₅₀ (algues) : ≤ 1 mg/l

R51 Toxique pour les organismes aquatiques

et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë : 96 h CL₅₀ (poisson) : 1 mg/l < CL₅₀ ≤ 10 mg/l
 ou 48 h CE₅₀ (daphnie) : 1 mg/l < CE₅₀ ≤ 10 mg/l
 ou 72 h CI₅₀ (algues) : 1 mg/l < CI₅₀ ≤ 10 mg/l

et la substance ne se dégrade pas facilement,
ou le log P_{OE} ≥ 3,0 (sauf si le BCF déterminé expérimentalement ≤ 100).

5.2.1.2. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer des phrases de risques compte tenu des critères suivants :

R52 Nocif pour les organismes aquatiques

et

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Toxicité aiguë :	96 h CL ₅₀ (poisson) :	10 mg/l < CL ₅₀ ≤ 100 mg/l
	ou 48 h CE ₅₀ (daphnie) :	10 mg/l < CE ₅₀ ≤ 100 mg/l
	ou 72 h CI ₅₀ (algues) :	10 mg/l < CI ₅₀ ≤ 100 mg/l

et la substance ne se dégrade pas facilement.

Ce critère s'applique sauf s'il existe des preuves scientifiques supplémentaires concernant la dégradation et/ou la toxicité, suffisantes pour fournir une garantie adéquate que ni la substance ni les produits de sa dégradation ne constitueront un danger potentiel à long terme et/ou différé pour l'environnement aquatique.

Ces preuves scientifiques supplémentaires doivent normalement se fonder sur les études requises au niveau I (annexe VIII) ou des études équivalentes et peuvent comprendre :

(i) un potentiel établi de dégradation rapide dans l'environnement aquatique;

^{os}(ii) une absence d'effets toxiques chroniques à une concentration de 1,0 mg/l, par exemple une concentration sans effet observé supérieure à 1,0 mg/l déterminée lors d'une étude prolongée de toxicité avec le poisson ou la daphnie.

R52 Nocif pour les organismes aquatiques

Substances qui n'entrent pas dans les critères repris ci-dessus dans le présent chapitre, mais qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leur toxicité, pourraient néanmoins présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes aquatiques.

R53 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique

Substances qui n'entrent pas dans les critères repris ci-dessus dans le présent chapitre, mais qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leur persistance, leur potentiel d'accumulation ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement pourraient néanmoins présenter un danger à long terme et/ou différé pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes aquatiques.

Par exemple, les substances peu solubles dans l'eau, c'est-à-dire dont la solubilité est inférieure à 1 mg/l, seront visées par ces critères si :

a) elles ne se dégradent pas facilement;

b) le log P_{OE} ≥ 3,0 (sauf si le BCF déterminé expérimentalement ≤ 100).

Ce critère s'applique sauf s'il existe des preuves scientifiques supplémentaires concernant la dégradation et/ou la toxicité, suffisantes pour fournir une preuve adéquate que ni la substance ni les produits de sa dégradation ne constitueront un danger potentiel à long terme et/ou différé pour l'environnement aquatique.

Ces preuves scientifiques supplémentaires doivent normalement se fonder sur les études requises au niveau I (annexe VIII) ou sur des études équivalentes et peuvent comprendre :

(i) un potentiel établi de dégradation rapide dans l'environnement aquatique;

(ii) une absence d'effets toxiques chroniques à la limite de solubilité, par exemple une concentration sans effet observé supérieure à une limite de solubilité déterminée lors d'une étude prolongée de toxicité avec le poisson ou la daphnie.

5.2.1.3. Commentaires relatifs à la détermination de CI₅₀ pour les algues et la dégradabilité facile

— Lorsque l'on peut démontrer, dans le cas de substances fortement colorées, que la croissance des algues est inhibée seulement par une réduction de l'intensité lumineuse, la 72 h CI50 pour les algues ne doit pas servir de base pour la classification.

— Les substances sont considérées comme se dégradant facilement si les critères suivants sont vérifiés :

A) si, lors d'études de biodégradation sur 28 jours, les niveaux de dégradation ci-après sont atteints :

- lors d'essais basés sur le carbone organique dissous : 70 %,

- lors d'essais basés sur la déperdition d'oxygène ou la production de gaz carbonique : 60 % des maxima théoriques.

Ces niveaux de biodégradation doivent être atteints dix jours après le commencement de la dégradation, ce point étant pris comme le moment où 10 % de la substance se sont dégradés;

ou

B) dans les cas où l'on dispose uniquement de données DCO et DBO₅, lorsque le rapport DBO₅/DCO est supérieur ou égal à 0,5;

ou

C) si l'on dispose d'autres preuves scientifiques convaincantes pour démontrer que la substance peut se dégrader (biotiquement et/ou abiotiquement) dans l'environnement aquatique jusqu'à un niveau supérieur à 70 % sur une période de 28 jours.

5.2.2. Environnement non aquatique

5.2.2.1. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer le symbole « N », l'indication de danger appropriée et des phrases de risque compte tenu des critères suivants :

R54 Toxique pour la flore R55, Toxique pour la faune, R56 Toxique pour les organismes du sol R57, Toxique pour les abeilles, R58 Peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement

Substances qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leur toxicité, persistance, potentiel d'accumulation ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger immédiat ou à long terme et/ou différé pour la structure et/ou le fonctionnement d'écosystèmes naturels autres que ceux visés à la section 5.2.1 ci-dessus. Des critères détaillés seront élaborés ultérieurement.

R59 Dangereux pour la couche d'ozone

Substances qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement de la couche d'ozone stratosphérique. Cette catégorie inclut les substances reprises à l'annexe I groupes I, II, III, IV et V du règlement (CEE) n° 594/91 du Conseil relatif aux substances qui détruisent la couche d'ozone (JO n° L 67 du 14.3.1991, p. 1).

5.2.2.2. Les substances seront classées comme dangereuses pour l'environnement et se verront attribuer des phrases de risque compte tenu des critères suivants;

R59 Dangereux pour la couche d'ozone

Substances n'entrant pas dans les critères précités à la section 5.2.2.1 qui, sur la base d'éléments disponibles concernant leurs propriétés ainsi que leur devenir et leur comportement prévus ou observés dans l'environnement, pourraient présenter un danger pour la structure et/ou le fonctionnement de la couche d'ozone stratosphérique. Cette catégorie inclut les substances reprises à l'annexe I groupe VI du règlement (CEE) n° 594/91 du Conseil relatif aux substances qui détruisent la couche d'ozone (JO n° L 67 du 14.3.1991, p. 1).

6. CHOIX DES CONSEILS DE PRUDENCE**6.1. Introduction**

Les conseils de prudence (phrases S) sont attribués aux substances et préparations dangereuses conformément aux critères généraux ci-après. En outre, pour certaines préparations, les conseils de prudence qui figurent à l'annexe II de l'A.R. du 11 janvier 1993 sont obligatoires.

Chaque fois que le fabricant est mentionné au chapitre 6, cela se réfère au responsable de la mise sur le marché de la substance ou de la préparation.

6.2. Conseils de prudence pour les substances et les préparations**S 1 Conserver sous clé**

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues au grand public.

S2 Conserver hors de portée des enfants

— Applicabilité :

- toutes les substances et préparations dangereuses.

— Critère d'utilisation :

- *obligatoire* pour toutes les substances et préparations dangereuses vendues au grand public, à l'exception de celles uniquement classées comme dangereuses pour l'environnement.

S3 Conserver dans un endroit frais

— Applicabilité :

- peroxydes organiques,

- autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les peroxydes organiques sauf si la phrase S47 est utilisée,

- recommandé pour les autres substances et préparations dangereuses dont le point d'ébullition est inférieur ou égal à 40 °C.

S4 Conserver à l'écart de tout local d'habitation

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques et toxiques.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux substances et préparations très toxiques et toxiques, le cas échéant pour compléter la phrase S13 (lorsqu'il y a par exemple un risque d'inhalation et que ces substances ou préparations doivent être entreposées à l'écart de tout local d'habitation). Ce conseil ne vise pas à exclure l'utilisation adéquate de ces substances ou préparations dans des locaux d'habitation.

S5 Conserver sous... (liquide à spécifier par le fabricant)

— Applicabilité :

- substances et préparations solides spontanément inflammables.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux tels que le sodium, le potassium ou le phosphore blanc.

S6 Conserver sous... (gaz inerte à spécifier par le fabricant)

— Applicabilité :

- substances et préparations dangereuses qui doivent être conservées en atmosphère inerte.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux tels que certains composés organo-métalliques.

S7 Conserver le récipient bien fermé

— Applicabilité :

- peroxydes organiques,

- substances et préparations pouvant donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques, toxiques, nocifs, ou extrêmement inflammables,

- substances et préparations qui, en contact avec l'humidité, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,

- solides facilement inflammables.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les peroxydes organiques,

- recommandé pour les autres domaines d'application précités.

S8 Conserver le récipient à l'abri de l'humidité

— Applicabilité :

- substances et préparations pouvant réagir violemment avec l'eau,
- substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,

- substances et préparations qui, en contact avec l'eau, donnent lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux domaines d'application précités, le cas échéant pour renforcer les avertissements donnés par les phrases R14 et R15, en particulier et R29.

S9 Conserver le récipient dans un endroit bien ventilé

— Applicabilité :

- substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,

- liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances et préparations volatiles pouvant donner lieu à des dégagements de vapeurs très toxiques, toxiques ou nocives,

- recommandé pour les liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables ou les gaz extrêmement inflammables.

S12 Ne pas fermer hermétiquement le récipient

— Applicabilité :

- substances et préparations susceptibles de faire éclater leur récipient par dégagement de gaz ou de vapeurs.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux précités.

S13 Conserver à l'écart des aliments et boissons, y compris ceux pour animaux

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques et nocives.

— Critères d'utilisation :

- recommandé lorsque de telles substances ou préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S14 Conserver à l'écart des... (matières incompatibles à indiquer par le fabricant)

— Applicabilité :

- peroxydes organiques.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les peroxydes organiques et limité normalement à ceux-ci. Peut toutefois être utile dans certains cas exceptionnels, lorsqu'une incompatibilité est susceptible d'entraîner un risque particulier.

S15 Conserver à l'écart de la chaleur

— Applicabilité :

- substances et préparations susceptibles de se décomposer ou de réagir spontanément sous l'effet de la chaleur.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux, tels que les monomères, mais non attribué si les phrases R2, R3 et/ou R5 sont déjà utilisées.

S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles — Ne pas fumer

— Applicabilité :

- liquides extrêmement inflammables ou facilement inflammables et gaz extrêmement inflammables.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances et préparations susmentionnées, sauf si les phrases R2, R3 et/ou R5 sont déjà employées.

S17 Tenir à l'écart des matières combustibles

— Applicabilité :

- substances et préparations pouvant constituer des mélanges explosibles ou spontanément inflammables avec des matières combustibles.

— Critères d'utilisation :

- à utiliser dans des cas spéciaux (pour insister sur les phrases R8 et R9, par exemple).

S18 Manipuler et ouvrir le récipient avec prudence

— Applicabilité :

- substances et préparations pouvant engendrer une surpression dans le récipient,

- substances et préparations pouvant entraîner la formation de peroxydes explosifs.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas précités lorsqu'il y a un risque de lésions oculaires et/ou lorsque ces substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S20 Ne pas manger et ne pas boire pendant l'utilisation

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux (par exemple l'arsenic et les composés d'arsenic, les fluoroacétates), notamment lorsque ces produits sont susceptibles d'être utilisés par le grand public.

S21 Ne pas fumer pendant l'utilisation

— Applicabilité :

- substances et préparations dont la combustion dégage des produits toxiques.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement à des cas spéciaux (composés halogénés, par exemple).

S22 Ne pas respirer les poussières

— Applicabilité :

- toutes les substances et préparations solides dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R42 est attribuée,

- recommandé pour les substances et préparations mentionnées ci-dessus vendues sous forme de poussières inhalables et pour lesquelles les dangers pour la santé consécutifs à une inhalation ne sont pas connus.

S23 Ne pas respirer les gaz/vapeurs/fumées/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]

— Applicabilité :

- toutes les substances et préparations dangereuses, liquides ou gazeuses, dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations précitées auxquelles la phrase R42 est attribuée,

- *obligatoire* pour les substances et préparations qui sont destinées à être utilisées par pulvérisation. La phrase S38 ou S51 doit également être attribuée,

- recommandé lorsqu'il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques d'inhalation non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances.

S24 Éviter le contact avec la peau

— Applicabilité :

- toutes les substances et préparations dangereuses pour la santé.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations auxquelles la phrase R43 a été attribuée, sauf si la phrase S36 a aussi été attribuée,

- recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec la peau, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances. Cependant, cette mention peut être utilisée pour souligner de telles phrases.

S25 Éviter le contact avec les yeux

— Applicabilité :

- substances et préparations corrosives ou irritantes.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement à des cas exceptionnels, par exemple lorsque l'on considère comme essentiel de souligner le risque pour les yeux indiqué par l'utilisation des phrases R34, R35, R36 ou R41. Ce conseil est donc important si ces substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public et qu'une protection des yeux ou du visage ne peut pas être disponible.

S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

— Applicabilité :

- substances et préparations corrosives ou irritantes.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations corrosives ainsi que pour les substances et préparations devant porter la phrase R41,

- recommandé pour les substances et préparations irritantes devant déjà porter la phrase R36.

S27 Enlever immédiatement tout vêtement souillé ou éclaboussé

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances et préparations très toxiques et toxiques qui sont facilement absorbées par la peau et pour les substances et préparations corrosives. Ce conseil de prudence ne doit toutefois pas être utilisé si la phrase S36 a été attribuée.

S28 Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec... (produits appropriés à indiquer par le fabricant)

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques ou corrosives.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations très toxiques,

- recommandé pour les autres substances et préparations précitées, en particulier lorsque l'eau ne constitue pas le liquide de rinçage le plus indiqué.

S29 Ne pas jeter les résidus à l'égout

— Applicabilité :

- liquides extrêmement ou facilement inflammables non miscibles avec l'eau.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances et préparations précitées qui sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S30 Ne jamais verser de l'eau dans le produit

— Applicabilité :

- substances et préparations réagissant violemment avec l'eau.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement à des cas spéciaux (acide sulfurique, par exemple); peut être utilisé, le cas échéant, pour donner l'information la plus claire possible, que ce soit pour souligner la phrase R14 ou comme alternative à cette même phrase R14.

S33 Éviter l'accumulation de charges électrostatiques

— Applicabilité :

- substances et préparations extrêmement ou très inflammables. — Critères d'utilisation :

— recommandé pour les substances et préparations utilisées par l'industrie qui n'absorbent pas l'humidité; n'est pratiquement jamais utilisé pour les substances et préparations mises sur le marché à destination du grand public.

S35 Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes précautions d'usage

— Applicabilité :

- substances et préparations explosives,
- substances et préparations très toxiques et toxiques,
- substances dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations explosives autres que les peroxydes organiques,
- recommandé pour les substances et préparations très toxiques et toxiques, en particulier lorsque de telles substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public,
- recommandé pour les substances dangereuses pour l'environnement auxquelles ne s'applique pas la phrase S56, lorsque ces substances sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S36 Porter un vêtement de protection approprié

— Applicabilité :

- peroxydes organiques,
- substances et préparations très toxiques, toxiques ou nocives,
- substances et préparations corrosives.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,
- *obligatoire* pour les substances et préparations auxquelles la phrase R21 ou R24 a été attribuée,
- *obligatoire* pour les substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la troisième catégorie, sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou préparation,
- *obligatoire* pour les peroxydes organiques,
- recommandé pour les substances et préparations toxiques lorsque la valeur DL50 par voie cutanée est inconnue, mais lorsque la substance ou préparation est susceptible d'être toxique par contact avec la peau,
- recommandé pour les substances et préparations utilisées dans l'industrie et qui sont susceptibles d'être nuisibles à la santé en cas d'exposition prolongée.

S37 Porter des gants appropriés

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques, toxiques, nocives ou corrosives,
- peroxydes organiques,
- substances et préparations irritantes pour la peau.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations très toxiques et corrosives,
- *obligatoire* pour les substances et préparations auxquelles la phrase R21, R24 ou R43 a été attribuée,
- *obligatoire* pour les substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de la troisième catégorie, sauf si les effets se manifestent uniquement en cas d'inhalation de la substance ou préparation,
- *obligatoire* pour les peroxydes organiques,
- recommandé pour les substances et préparations toxiques lorsque la valeur DL50 par voie cutanée est inconnue, mais lorsque la substance ou préparation est susceptible d'être toxique par contact avec la peau,
- recommandé pour les substances et préparations irritantes pour la peau à cause de leurs propriétés dégraissantes.

S38 En cas de ventilation insuffisante, porter un appareil respiratoire approprié

— Applicabilité :

- substances et préparations très toxiques ou toxiques.

— Critères d'utilisation :

- limité normalement aux cas spéciaux où des substances et préparations très toxiques ou toxiques sont utilisées dans l'industrie ou l'agriculture.

S39 *Porter un appareil de protection des yeux/du visage*

- Applicabilité :
- peroxydes organiques,
- substances et préparations corrosives y compris les irritants susceptibles de provoquer de graves lésions oculaires,
- substances et préparations très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation :
- *obligatoire* pour les substances et préparations auxquelles la phrase R34, R35 ou R41 a été attribuée,
- *obligatoire* pour les peroxydes organiques,
- recommandé quand il est nécessaire d'attirer l'attention de l'utilisateur sur les risques qu'entraîne un contact avec les yeux, non mentionnés dans les phrases de risque qui doivent être attribuées à ces substances,
- limité normalement aux cas exceptionnels où sont utilisées des substances et préparations très toxiques et toxiques, lorsqu'il peut y avoir des éclaboussures et que ces substances et préparations sont susceptibles d'être facilement absorbées par la peau.

S40 *Pour nettoyer le sol ou les objets souillés par ce produit, utiliser...* (à préciser par le fabricant)

- Applicabilité :
- toutes les substances et préparations dangereuses.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement aux substances et préparations dangereuses pour lesquelles l'eau n'est pas considérée comme un agent nettoyant adéquat (lorsqu'il faut recourir à l'absorption par un matériau pulvérulent, à une dissolution par un solvant, etc.) et au cas où il est important, pour des raisons sanitaires ou pour des raisons de sécurité, de faire figurer un avertissement sur l'étiquette.

S41 *En cas d'incendie et/ou d'explosion, ne pas respirer les fumées*

- Applicabilité :
- substances et préparations dangereuses dont la combustion donne lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux.

S42 *Pendant les fumigations/pulvérisations, porter un appareil respiratoire approprié* [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant]

- Applicabilité :
- substances et préparations destinées à cet usage, mais susceptibles de compromettre la santé et la sécurité de l'utilisateur si des mesures de précaution ne sont pas prises.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux.

S43 *En cas d'incendie, utiliser...* (moyens d'extinction à préciser par le fabricant; si l'eau augmente les risques, ajouter : *Ne jamais utiliser d'eau*)

- Applicabilité :
- substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables.
- Critères d'utilisation :
- *obligatoire* pour les substances et préparations qui, en contact avec l'eau ou avec l'air humide, donnent lieu à des dégagements de gaz extrêmement inflammables,
- recommandé pour les substances et préparations extrêmement inflammables, facilement inflammables et inflammables, particulièrement lorsqu'elles ne se mélangent pas à l'eau.

S45 *En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)*

- Applicabilité :
- substances et préparations très toxiques,
- substances et préparations toxiques et corrosives.
- Critères d'utilisation :
- *obligatoire* pour les substances et préparations précitées.

S46 *En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette*

- Applicabilité :
- toutes les substances et préparations dangereuses autres que celles qui sont très toxiques, toxiques, corrosives ou dangereuses pour l'environnement.
- Critères d'utilisation :
- *obligatoire* pour toutes les substances et préparations précitées susceptibles d'être utilisées par le grand public, sauf si l'ingestion de ces produits, particulièrement par des enfants, peut être considérée comme inoffensive.

S47 *Conserver à une température ne dépassant pas... °C* (à préciser par le fabricant)

- Applicabilité :
- substances et préparations devenant instables à une certaine température.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux (certains peroxydes organiques, par exemple).

S48 *Maintenir humide avec...* (moyen approprié à préciser par le fabricant)

- Applicabilité :
- substances et préparations pouvant devenir très sensibles aux étincelles, au frottement ou au choc si on les laisse se dessécher.
- Critères d'utilisation :
- limité normalement à des cas spéciaux, tels que les nitrocelluloses.

S49 Conserver uniquement dans le récipient d'origine

— Applicabilité :

- substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique.

— Critères d'utilisation :

- substances et préparations sensibles à la décomposition catalytique (par exemple certains peroxydes organiques).

S50 Ne pas mélanger avec... (à spécifier par le fabricant)

— Applicabilité :

- substances et préparations pouvant réagir avec le produit spécifié et donner lieu à des dégagements de gaz très toxiques ou toxiques,

- peroxydes organiques.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances et préparations susceptibles d'être utilisées par le grand public, lorsque cette mention est préférable aux phrases R31 ou R32,

- *obligatoire* avec certains peroxydes pouvant donner lieu à des réactions violentes face à des accélérateurs ou à des promoteurs.

S51 Utiliser seulement dans des zones bien ventilées

— Applicabilité :

- substances et préparations pouvant ou devant donner lieu à des dégagements de vapeurs, de poussière, d'aérosols, de fumées, de brouillards, etc., faisant courir des risques par inhalation ou des risques d'incendie ou d'explosion.

— Critères d'utilisation :

- recommandé lorsque la phrase S38 n'est pas indiquée. L'emploi de cette mention est donc important lorsque de telles substances et préparations sont susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S52 Ne pas utiliser sur de grandes surfaces dans les locaux habités

— Applicabilité :

- substances volatiles, très toxiques, toxiques et nocives et préparations les contenant.

— Critères d'utilisation :

- recommandé lorsque la santé peut être affectée par une exposition prolongée à ces substances à cause de leur volatilisation à partir de grandes surfaces traitées dans les logements ou autres endroits clos où des personnes se réunissent.

S53 Éviter l'exposition — Se procurer des instructions spéciales avant l'utilisation

— Applicabilité :

- substances et préparations cancérigènes, mutagènes et/ou toxiques pour la reproduction.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations mentionnées ci-dessus auxquelles a été attribuée au moins une des phrases R suivantes : R45, R46, R47, R49, R60 ou R61.

S56 Éliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux

— Applicabilité :

- substances dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances auxquelles a été attribué le symbole « N » et susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S57 Utiliser un récipient approprié pour éviter toute contamination du milieu ambiant

— Applicabilité :

- substances auxquelles a été attribué le symbole « N ».

— Critères d'utilisation :

- normalement limité aux substances qui ne sont pas susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S59 Consulter le fabricant/fournisseur pour des informations relatives à la récupération/au recyclage

— Applicabilité :

- substances dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances dangereuses pour la couche d'ozone,

- recommandé pour les substances auxquelles a été attribué le symbole « N » et pour lesquelles la récupération/le recyclage sont recommandés.

S60 Éliminer le produit et/ou son récipient comme un déchet dangereux

— Applicabilité :

- substances dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

- recommandé pour les substances auxquelles a été attribué le symbole « N », non susceptibles d'être utilisées par le grand public.

S61 Éviter le rejet dans l'environnement; consulter les instructions spéciales/la fiche de données de sécurité

— Applicabilité :

- substances dangereuses pour l'environnement.

— Critères d'utilisation :

- normalement utilisé pour les substances auxquelles a été attribué le symbole « N »,

- recommandé pour toutes les substances classées comme dangereuses pour l'environnement non visées ci dessus.

S62 *En cas d'ingestion, ne pas faire vomir, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette*

— Applicabilité :

- substances et préparations liquides qui ont une viscosité cinématique, mesurée par viscosimètre rotatif conformément à la norme ISO 3219 ou une méthode équivalente, inférieure à $7 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{sec}$ à 40°C et qui contiennent des hydrocarbures aliphatiques, alicycliques et/ou aromatiques à une concentration totale égale ou supérieure à 10 %,

- ne s'applique pas aux substances et préparations mises sur le marché en aérosol.

— Critères d'utilisation :

- *obligatoire* pour les substances et préparations précitées si elles sont vendues ou susceptibles d'être utilisées par le grand public,

- recommandé pour les substances et préparations précitées lorsqu'elles sont utilisées dans l'industrie.

7. ETIQUETAGE

7.1. Après détermination de la classification d'une substance ou d'une préparation, l'étiquette appropriée est établie en se référant aux prescriptions de l'article 8, § 1^{er} du présent arrêté et de l'article 9 de l'A.R. du 11 janvier 1993, respectivement pour les substances et les préparations. La présente section explique le mode de détermination de l'étiquette et elle fournit en particulier une orientation sur le mode de sélection des phrases de risque et des conseils de prudence.

L'étiquette porte les indications suivantes :

- a) le ou les noms des substances devant figurer sur l'étiquette;
- b) les noms, adresse et numéro de téléphone du fabricant/de l'importateur;
- c) les symboles et indications de danger;
- d) les phrases indiquant les risques particuliers (phrases R);
- e) les phrases indiquant les conseils de prudence (phrases S);
- f) pour les substances, le numéro CEE.

7.1.1. Pour les substances figurant à l'annexe I du présent arrêté, l'étiquette porte aussi la mention « étiquetage CEE ».

7.1.2. Choix final des phrases de risque et des conseils de prudence

Bien que le choix final des phrases R et S les plus adéquates soit régi, en premier lieu, par la nécessité de fournir toutes les informations indispensables, il convient également de tenir compte de la clarté et de l'impact de l'étiquette. Par souci de clarté, l'information nécessaire devrait être exprimée en un nombre minimal de phrases.

Dans le cas des substances et préparations irritantes, facilement inflammables, inflammables et comburantes, il n'est pas nécessaire de rappeler les phrases R et S si le contenu de l'emballage ne dépasse pas 125 ml. Il en est de même pour les substances nocives, de même volume, qui ne sont pas vendues au détail au grand public.

7.1.3. Les indications telles que « non toxique », « non nocif » ou toute autre indication analogue ne doivent pas figurer sur l'étiquette ou sur l'emballage des substances relevant du présent arrêté, ou des préparations relevant de l'A.R. du 11 janvier 1993.

7.1.4. Pour certaines préparations, l'annexe II de l'A.R. du 11 janvier 1993 prévoit des prescriptions spéciales relatives à l'étiquetage.

7.2. Nom(s) chimique(s) à faire figurer sur l'étiquette

7.2.1. Pour les substances reprises à l'annexe I du présent arrêté, l'étiquette doit porter le nom des substances sous une des dénominations qui figurent à l'annexe I.

Pour les substances non reprises à l'annexe I, le nom est donné en utilisant une nomenclature chimique internationalement reconnue, telle qu'elle est définie à la section 1.4.

7.2.2. Pour les préparations, le choix des noms à faire figurer sur l'étiquette est régi par les règles fixées à l'article 9 paragraphe I point c) de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Remarque :

Dans le cas des préparations concentrées destinées à l'industrie du parfum :

— la personne responsable de leur mise sur le marché peut simplement identifier la substance sensibilisante qu'elle considère comme principalement responsable du risque de sensibilisation,

— dans le cas d'une substance, le nom chimique peut être du type « huile essentielle de... », « extrait de... », plutôt que le nom des constituants de cette huile essentielle ou de cet extrait.

7.3. Choix des symboles de danger

Le dessin des symboles de danger et le libellé des indications de danger doivent être conformes à ceux de l'annexe II. Le symbole est imprimé en noir sur fond jaune orangé.

7.3.1. Pour les substances reprises à l'annexe I, les symboles et indications de danger sont ceux indiqués à l'annexe.

7.3.2. Pour les substances dangereuses qui ne sont pas encore reprises à l'annexe I et pour les préparations, les symboles et indications de danger sont attribués selon les règles établies dans la présente annexe.

Lorsque plus d'un symbole de danger est attribué à une substance :

— l'obligation d'apposer le symbole « T » rend facultatifs les symboles « X » et « C »,

— l'obligation d'apposer le symbole « C » rend facultatif le symbole « X »,

— l'obligation d'apposer le symbole « E » rend facultatifs les symboles « F » et « O ».

7.4. Choix des phrases R

Le libellé des phrases R doit être conforme à celui indiqué dans l'annexe III du présent arrêté.

Les phrases R combinées de l'annexe III doivent être utilisées, le cas échéant.

7.4.1. Pour les substances reprises à l'annexe I, les phrases R sont celles indiquées à l'annexe.

7.4.2. Pour les substances qui ne figurent pas à l'annexe I, les phrases R sont attribuées selon les critères et priorités ci-après :

a) dans le cas de danger donnant lieu à des effets sur la santé :

(i) les phrases R correspondant à la catégorie de danger illustrée par un symbole doivent figurer sur l'étiquette;
(ii) les phrases R correspondant aux autres catégories de danger qui ne sont pas illustrées par un symbole conformément à l'article 8, § 1^{er} du présent arrêté.

b) dans le cas de dangers dérivant des propriétés physico-chimiques :

— les critères décrits à la section 7.4.2 point a) ci-dessus sont applicables, excepté les phrases de risque « extrêmement inflammables » ou « facilement inflammables » qui ne doivent pas être indiquées lorsqu'elles constituent une répétition de la formulation de l'indication de danger, représentée au moyen d'un symbole;

c) dans le cas d'un risque pour l'environnement :

— les phrases R correspondant à la catégorie de classification « dangereux pour l'environnement » doivent figurer sur l'étiquette.

7.4.3. Pour les préparations, les phrases R seront choisies conformément aux critères et priorités ci-après :

a) dans le cas de dangers engendrant des effets sur la santé :

(i) les phrases R qui correspondent à la catégorie de danger illustrée par un symbole. Dans certains cas, les phrases R doivent être adaptées conformément aux tableaux de l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993. Plus spécifiquement, les phrases R du ou des constituants qui justifient le classement de la préparation dans une catégorie de danger doivent figurer sur l'étiquette;

(ii) les phrases R qui correspondent aux autres catégories de danger qui ont été attribuées aux constituants mais qui ne sont pas illustrées par un symbole conformément à l'article 9 paragraphe 1 point d) de l'A.R. du 11 janvier 1993;

b) dans le cas de dangers dérivant des propriétés physico-chimiques :

— les critères décrits à la section 7.4.3 point a) sont applicables; toutefois, les phrases de risque « extrêmement inflammable » ou « facilement inflammable » ne doivent pas être indiquées lorsqu'elles constituent une répétition de la formulation de l'indication de danger, représentée au moyen d'un symbole.

En règle générale, s'appliquant aux préparations, un maximum de quatre phrases R suffira à décrire le risque; à cette fin, les phrases combinées inventoriées à l'annexe III sont considérées comme des phrases uniques. Les phrases types doivent cependant couvrir tous les risques principaux associés à la préparation.

Toutefois, si le fabricant estime qu'il est nécessaire d'identifier des risques pour l'environnement, les phrases R utiles devront être ajoutées.

7.5. Conseils de prudence

Le libellé des phrases S doit être conforme à celui indiqué à l'annexe IV du présent arrêté.

Les phrases S combinées de l'annexe IV doivent être utilisées, le cas échéant.

7.5.1. Pour les substances figurant à l'annexe I, les phrases S sont celles indiquées dans l'annexe.

Lorsqu'aucune phrase S n'est indiquée, le fabricant/l'importateur peut ajouter toute(s) phrase(s) appropriée(s).

7.5.2. Sélection des conseils de prudence

Le choix final des phrases S doit tenir compte des phrases R indiquées sur l'étiquette et de l'utilisation envisagée pour la substance ou la préparation :

— en règle générale, un maximum de quatre phrases S suffira à formuler le conseil de prudence le plus adéquat; à cette fin, les phrases combinées inventoriées à l'annexe IV sont considérées comme des phrases uniques,

— dans le cas de risques pour l'environnement, il faut employer une phrase S au minimum et quatre au maximum,

— certaines phrases R deviennent superflues si l'on opère un choix judicieux de phrases S et inversement; les phrases S donnant des conseils manifestement en rapport avec les phrases R seront reproduites sur l'étiquette uniquement s'il s'agit de mettre particulièrement l'accent sur un avertissement spécifique,

— dans le choix des phrases S, on accordera une attention toute spéciale aux conditions prévisibles d'utilisation de certaines substances et préparations, par exemple la pulvérisation ou tous autres effets d'aérosols; les phrases doivent être sélectionnées en fonction de l'utilisation prévue;

— les conseils de prudence S1, S2 et S45 sont obligatoires pour toutes les substances et préparations très toxiques, toxiques et corrosives vendues au grand public;

— les conseils de prudence S2 et S46 sont obligatoires pour toutes les autres substances (à l'exception de celles classées seulement comme dangereuses pour l'environnement) et les préparations dangereuses vendues au grand public.

7.6. Le numéro CEE

Si une substance mentionnée sur l'étiquette est inscrite dans l'Inventaire européen de substances commerciales existantes (Einecs) ou dans la Liste européenne des substances notifiées (Elincs), les numéros Einecs et Elincs de la substance doivent figurer sur l'étiquette. Cette disposition ne s'applique pas aux préparations.

8. CAS PARTICULIERS : SUBSTANCES

8.1. Bouteilles de gaz transportables

Pour les bouteilles de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont respectées lorsqu'elles sont conformes à l'article 8, § 1^{er} ou § 2, point 6^b, du présent arrêté.

Toutefois, par dérogation à l'article 8, § 2, points 1^o et 2^o, pour les bouteilles de gaz ayant une capacité en eau inférieure ou égale à 150 litres, il est possible d'utiliser une des alternatives suivantes :

— le format et les dimensions de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISO/DP 7225,

— les informations visées à l'article 8, § 1^{er}, 1^o du présent arrêté peuvent être fournies sur un disque ou une étiquette durable, solidement fixé sur la bouteille.

8.2. Métaux sous forme massive

Ces substances sont classées à l'annexe I du présent arrêté ou doivent l'être conformément à l'article 3, § 4 du présent arrêté. Bien que classées conformément à l'article 1^{er}, § 4 du présent arrêté, certaines de ces substances ne présentent toutefois pas, sous leur forme commercialisée, de danger pour la santé de l'homme en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau. Pareilles substances ne requièrent pas d'étiquette en vertu de l'article 8, § 1^{er} du présent arrêté. Cependant, toutes les informations qui auraient dû figurer sur l'étiquette devront être communiquées à l'utilisateur par la personne responsable de la mise sur le marché du métal, sous une forme prévue à l'article 9, § 2 du présent arrêté.

9. CAS PARTICULIERS : PRÉPARATIONS

9.1. Préparations gazeuses (mélanges de gaz)

Pour les préparations gazeuses, il faut tenir compte :

- de l'évaluation des propriétés physico-chimiques,
- de l'évaluation des dangers pour la santé.

9.1.1. Évaluation des propriétés physico-chimiques

9.1.1.1. Inflammabilité

Les propriétés d'inflammabilité de ces préparations sont déterminées conformément à l'article 5 paragraphe 2 de l'A.R. du 11 janvier 1993 selon les méthodes spécifiées à l'annexe V partie A du présent arrêté. Ces préparations seront classées en fonction des résultats des essais effectués et selon les critères de l'annexe V et ceux du guide de classification.

Toutefois, par dérogation, dans le cas où ces préparations gazeuses sont produites sur commande en petites quantités, l'inflammabilité de ces mélanges gazeux peut être évaluée grâce à la méthode de calcul suivante :

L'expression du mélange de gaz :

$$A_1 F_1 + \dots + A_i F_i + \dots + A_n F_n + B_1 I_1 + \dots + B_i I_i + \dots + B_p I_p$$

où : A_i et B_i sont les fractions molaires,

F_i est un gaz inflammable,

I_i est un gaz inerte,

n est le nombre de gaz inflammables,

p est le nombre de gaz inertes,

peut être transformée sous une forme dans laquelle tous les I_i (gaz inertes) sont exprimés par un équivalent-azote, en utilisant un coefficient K_i , et dans laquelle la teneur équivalente en gaz inflammables A'_i s'exprime comme suit :

$$A'_i = A_i \times \left(\frac{100}{(A_i + K_i B_i)} \right)$$

En utilisant la valeur de la teneur maximale en gaz inflammables qui, dans un mélange contenant de l'azote, donne une composition qui n'est pas inflammable à l'air (T_{ci}), on peut obtenir l'expression suivante :

$$\sum_i A'_i / T_{ci} \leq 1$$

Le mélange de gaz est inflammable lorsque la valeur de l'expression précitée est supérieure à 1. La préparation est classée extrêmement inflammable et la phrase R12 est attribuée.

Coefficients d'équivalence (K_i)

Les valeurs des coefficients d'équivalence K_i entre les gaz inertes et l'azote ainsi que les valeurs de la teneur maximale en gaz inflammables (T_{ci}) figurent aux tableaux 1 et 2 de la norme ISO/DIS 10156 édition 15 décembre 1990.

Teneur maximale en gaz inflammables (T_{ci})

La valeur de la teneur maximale en gaz inflammables (T_{ci}) figure au tableau 2 de la norme ISO/DIS 10 156 édition 15 décembre 1990.

Lorsque la valeur T_{ci} d'un gaz inflammable ne figure pas dans la norme précitée, on utilisera la limite inférieure d'explosibilité (LIE). S'il n'existe aucune valeur LIE, la valeur T_{ci} sera fixée à 1 % en volume.

Remarques :

— L'expression susmentionnée peut être employée pour permettre un étiquetage approprié des préparations gazeuses; elle ne doit cependant pas être considérée comme une méthode remplaçant l'expérimentation dans la détermination des paramètres techniques de sécurité.

— Par ailleurs, cette expression ne donne aucune information sur la possibilité de préparer ou non en toute sécurité un mélange contenant des gaz comburants. Ces derniers ne sont pas pris en considération dans l'évaluation de l'inflammabilité.

— L'expression susmentionnée ne donnera des résultats fiables que si les gaz inflammables ne s'influencent pas mutuellement du point de vue de leur inflammabilité. Il faut tenir compte de cet aspect, par exemple avec les hydrocarbures halogénés.

9.1.1.2. Propriétés comburantes

L'annexe V du présent arrêté ne contenant pas de méthode relative à la détermination des propriétés comburantes des mélanges gazeux, lesdites propriétés doivent être évaluées selon la méthode d'estimation ci-après.

Le principe de cette méthode est de comparer le potentiel comburant des gaz dans un mélange au potentiel comburant de l'oxygène dans l'air. Les concentrations des gaz dans le mélange s'expriment en pourcentage en volume.

On considère que le mélange de gaz est aussi comburant ou plus comburant que l'air si la condition suivante est vérifiée :

$$\sum_i x_i c_i \geq 21$$

où : x_i est la concentration de gaz i en pourcentage en volume,

c_i est le coefficient d'équivalence oxygène.

Dans ce cas, la préparation est classée comme comburante et se voit attribuer la phrase R8.

Coefficient d'équivalence entre les gaz comburants et l'oxygène

Les coefficients utilisés dans le calcul visant à déterminer le pouvoir comburant de certains gaz dans un mélange par rapport au pouvoir comburant de l'oxygène dans l'air, repris au point 5.2 de

la norme ISO/DIS 10156, sont les suivants :

O_2 1

N_2 0,6

Lorsqu'il n'existe pas de valeur du coefficient (c_i) pour une substance gazeuse dans la norme citée, une valeur de 40 est attribuée à ce coefficient.

9.1.2. Évaluation des effets sur la santé

L'évaluation des dangers présentés par une préparation pour la santé est faite conformément à l'article 5 paragraphe 3 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Lorsque l'évaluation des dangers pour la santé s'effectue selon la méthode conventionnelle décrite à l'article 5, paragraphe 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993, en se référant aux limites individuelles de concentration, les limites individuelles de concentration à utiliser s'expriment en pourcentage en volume et figurent :

- soit à l'annexe I du présent arrêté pour le ou les gaz considérés,
- soit à l'annexe I de l'A.R. du 11 janvier 1993, tableaux I A à VI A, lorsque le ou les gaz considérés ne figurent pas à l'annexe I ou y figurent sans limites de concentration.

9.1.3. Étiquetage

Pour les conteneurs de gaz transportables, on considère que les prescriptions relatives à l'étiquetage sont conformes lorsqu'elles sont conformes à l'article 10, paragraphe 5 de l'A.R. du 11 janvier 1993.

Toutefois, par dérogation à l'article 10 paragraphes I et 2 de l'A.R. du 11 janvier 1993, pour les bonbonnes de gaz ayant une capacité inférieure ou égale à 150 litres, le format et la dimension de l'étiquette peuvent respecter les prescriptions de la norme ISO/DP 7225. Dans ce cas, l'étiquette peut mentionner le nom générique ou le nom industriel/commercial de la préparation pour autant que les substances dangereuses de la préparation figurent de façon lisible et indélébile sur le corps de la bonbonne de gaz.

9.2. Alliages, préparations contenant des polymères et préparations contenant des élastomères

Ces préparations seront classées conformément aux exigences de l'article 5 et étiquetées conformément aux exigences de l'article 9 de l'A.R. du 11 janvier 1993. Bien que classées conformément à l'article 5, certaines de ces préparations ne présentent toutefois pas, dans leur forme commercialisée, de danger pour la santé de l'homme en cas d'inhalation, d'ingestion ou de contact avec la peau. De telles préparations ne requièrent pas d'étiquetage en vertu de l'article 9 de l'A.R. Cependant, toutes les informations qui auraient dû figurer sur l'étiquette devront être communiquées à l'utilisateur professionnel au moyen d'un système d'information sous la forme prévue à l'article 12 de l'arrêté royal précité.

9.3. Peroxydes organiques

Les peroxydes organiques combinent les propriétés d'une substance comburante et d'une substance combustible en une seule molécule : lorsqu'un peroxyde organique se décompose, la partie comburante de la molécule réagit exothermiquement avec la partie combustible (oxydable).

En ce qui concerne les propriétés comburantes, les méthodes reprises à l'annexe V ne peuvent être appliquées aux peroxydes organiques.

Il y a lieu d'utiliser la méthode de calcul suivante, basée sur la présence d'oxygène actif.

La teneur en oxygène (%) d'une préparation de peroxyde organique s'obtient par la formule :

$$16 \times \sum(n_i \times c_i / m_i)$$

où :

n_i = nombre de groupes peroxyde par molécule de peroxyde organique i ,

c_i = concentration (masse en %) du peroxyde organique i ,

m_i = masse moléculaire du peroxyde organique i .

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

BIJLAGE VII A

GEGEVENS DIE IN HET IN ARTIKEL 2, § 1, 1°,
BEDOELDE TECHNISCH DOSSIER (BASISDOSSIER)
MOETEN WORDEN OPGENOMEN

Indien het technisch gezien niet mogelijk is of wetenschappelijk gezien niet noodzakelijk lijkt deze gegevens te verstrekken, moeten de redenen daarvoor duidelijk worden vermeld en door de bevoegde instantie worden aanvaard.

De naam van de voor het uitvoeren van de onderzoeken verantwoordelijke instelling(en) dient te worden vermeld.

0. IDENTITEIT VAN DE FABRIKANT EN IDENTITEIT VAN DE KENNISGEVER; LIGGING VAN HET PRODUKTIETERREIN

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als enige vertegenwoordiger van de fabrikant: de identiteit en de adressen van de importeurs die de stof op het grondgebied van de Gemeenschap brengen.

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.1. Benaming

- 1.1.1. Naam volgens de nomenclatuur van de IUPAC.
- 1.1.2. Andere namen (gewone naam, handelsbenaming, afkorting).
- 1.1.3. CAS-nummer en CAS-benaming (indien beschikbaar).

1.2. Molecuulformule en structuurformule

1.3. Samenstelling van de stof

- 1.3.1. Zuiverheidsgraad (in %).
- 1.3.2. Aard van de onzuiverheden, met inbegrip van isomeren en bijproducten.
- 1.3.3. Percentage van de voornaamste (significante) onzuiverheden.
- 1.3.4. Indien de stof een stabilisator, een inhibitor of andere additieven bevat, moeten hiervan de aard en het gehalte (ppm, %) worden vermeld.
- 1.3.5. Spectraalgegevens (UV, IR, NMR of massaspectrum).
- 1.3.6. HPLC, GC.

1.4. Detectie- en determinatiemethodes

Volledige beschrijving van de gebruikte methodes of bibliografische referenties van deze methodes.

Naast informatie over detectie- en bepalingmethoden moet informatie worden verschaft over de analysemethoden die de kennisgever bekend zijn en waarmee de aanwezigheid van een stof en de omzettingen daarvan na lozing in het milieu kan worden aangetoond en rechtstreekse blootstelling van mensen kan worden vastgesteld.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.0. Productie

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die voor mens en milieu aan het productieproces kunnen zijn verbonden. Precieze details over het productieproces, met name commercieel gevoelige details, worden niet vereist.

- 2.0.1. Bij de productie toegepast(e) technologisch(e) procédé(s).
- 2.0.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van de productie:
 - werkomgeving,
 - milieu.

2.1. Beoogde gebruiksdoeleinden

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende, doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die, gelet op de beoogde/te verwachten gebruiksdoeleinden, voor mens en milieu aan de stoffen kunnen zijn verbonden.

- 2.1.1. Aard van het gebruik: beschrijving van de functie en de nagestreefde effecten.
 - 2.1.1.1. Technologisch(e) procédé(s) waarbij de stof wordt gebruikt (voor zover bekend).
 - 2.1.1.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van het gebruik (voor zover bekend):

ANNEXE VII A

CARACTERISTIQUES FAISANT L'OBJET DU DOSSIER TECHNIQUE
(DOSSIER DE BASE) VISE A L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 1er, 1°

S'il n'est pas possible techniquement ou s'il ne paraît pas scientifiquement nécessaire de fournir une information, les raisons devront en être clairement indiquées et seront soumises à l'approbation des autorités compétentes.

Le nom du ou des organismes responsables de la réalisation des études sera indiqué.

0. IDENTITE DU FABRICANT ET IDENTITE DU NOTIFIANT; LOCALISATION DU LIEU DE PRODUCTION

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, l'identité et l'adresse des importateurs qui importeront la substance dans la Communauté.

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.1. Nom

- 1.1.1. Noms suivant la nomenclature de l'UICPA.
- 1.1.2. Autres noms (nom commun, nom commercial, abréviation).
- 1.1.3. Numéro et dénomination CAS (si disponibles).

1.2. Formule brute et formule développée

1.3. Composition de la substance

- 1.3.1. Pureté en pourcentage (%).
- 1.3.2. Nature des impuretés, y compris les isomères et les sous-produits.
- 1.3.3. Pourcentage des impuretés principales (significatives).
- 1.3.4. Si la substance contient un stabilisant ou un inhibiteur ou d'autres additifs, en préciser la nature, l'ordre de grandeur: ppm; %.
- 1.3.5. Données spectrales (UV, IR, RMN ou spectre de masse).
- 1.3.6. HPLC, GC.

1.4. Méthodes de détection et de détermination

Description complète des méthodes utilisées ou indication des références bibliographiques.

Outre l'indication des méthodes de détection et de dosage, le notifiant doit présenter les méthodes d'analyse dont il a connaissance et qui permettent de suivre la substance et ses produits de transformation après leur introduction dans l'environnement ou de déterminer l'exposition humaine directe.

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.0. Production

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que le processus de production peut présenter pour l'homme et l'environnement. Les détails précis concernant le processus de fabrication, et notamment ceux qui sont particulièrement sensibles du point de vue commercial, ne sont pas exigés.

- 2.0.1. Procédé technologique utilisé pour la production.
- 2.0.2. Estimation de l'exposition relative à la production:
 - milieu de travail,
 - environnement.

2.1. Utilisations envisagées

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que les substances, compte tenu des utilisations envisagées/prévisibles, peuvent présenter pour l'homme et l'environnement.

- 2.1.1. Types d'utilisation: description de la fonction et des effets recherchés.
 - 2.1.1.1. Procédés technologiques relatifs à l'utilisation de la substance [lorsqu'il(s) est/sont connu(s)].
 - 2.1.1.2. Prévision(s) de l'exposition relative(s) à l'utilisation [lorsqu'elle(s) est/sont connue(s)]:

— werkomgeving, — milieu.	— milieu de travail, — environnement.
2.1.1.3. Vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht : stof, preparaat, produkt.	2.1.1.3. Forme sous laquelle la substance est mise sur le marché : substance, préparation, produit.
2.1.1.4. Concentratie van de stof in preparaten en produkten die in de handel worden gebracht (voor zover bekend).	2.1.1.4. Concentration de la substance dans les préparations ou les produits mis sur le marché (lorsqu'elle est connue).
2.1.2. Toepassingsgebieden met geraamde onderverdeling : — industrie, — landbouwers en ambachtslieden, — gebruik door het grote publiek.	2.1.2. Domaines d'application avec ventilation approximative : — industries, — professionnels de l'agriculture et de l'artisanat, — utilisation par le grand public.
2.1.3. Voor zover bekend en indien van toepassing, de identiteit van de afnemers van de stof.	2.1.3. Si approprié, identité des clients (lorsqu'elle est connue).
2.1.4. Hoeveelheden afval en samenstelling van het afval dat uit de beoogde gebruiksdoeleinden voortvloeit (voor zover bekend).	2.1.4. Quantité et composition des déchets résultant de l'utilisation envisagée (lorsqu'elles sont connues).
2.2. Geraamde produktie en/of invoer voor elk der beoogde gebruiksdoeleinden of -sectoren	2.2. Production et/ou importation prévue pour chacune des utilisations ou des domaines d'utilisation envisagés
2.2.1. Totale produktie en/of invoer in ton per jaar : — in het eerste kalenderjaar, — in de volgende kalenderjaren. Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als de alleenvertegenwoordiger van de fabrikant, moet deze informatie voor elk van de onder rubriek O bedoelde importeurs worden verschaft.	2.2.1. Production et/ou importation globale, exprimée en tonnes, par an : — la première année civile, — les années civiles suivantes. Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, cette information doit être donnée pour chacun des importateurs identifiés au point 0.
2.2.2. Produktie en/of invoer, opgesplitst volgens de punten 2.1.1. en 2.1.2. (in %) : — in het eerste kalenderjaar, — in de volgende kalenderjaren.	2.2.2. Production et/ou importation ventilée suivant les points 2.1.1. et 2.1.2. et exprimée en pourcentage : — la première année civile, — les années civiles suivantes.
2.3. Aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen :	2.3. Méthodes et précautions recommandées relatives :
2.3.1. — bij behandeling;	2.3.1. — à la manipulation;
2.3.2. — bij opslag;	2.3.2. — au stockage;
2.3.3. — bij vervoer;	2.3.3. — au transport;
2.3.4. — bij brand (aard van de verbrandings- of pyrolysegassen, indien dit, gezien het beoogde gebruik, noodzakelijk is).	2.3.4. — à l'incendie (nature des gaz de combustion ou pyrolyse, lorsque les usages envisagés le justifient).
2.3.5. Andere gevaren, met name chemische reactie met water.	2.3.5. Autres dangers, notamment réaction chimique avec l'eau.
2.3.6. Indien van toepassing, informatie over mogelijk ontploffingsgevaar van de stof wanneer deze zich in stofvormige toestand voordoet.	2.3.6. Le cas échéant, informations sur le risque d'explosion de la substance, lorsqu'elle se présente sous forme de poussières.
2.4. Noodmaatregelen in geval van incidenteel vrijkomen	2.4. Mesures d'urgence en cas de dispersion accidentelle
2.5. Noodmaatregelen in geval van ongevallen met personen (bij voorbeeld vergiftiging)	2.5. Mesures d'urgence en cas de dommages corporels (par exemple empoisonnement)
2.6. Verpakking	2.6. Emballage
3. FYSICH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF	3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA SUBSTANCE
3.0. Toestand van de stof bij 20 °C en 101,3 kPa	3.0. Etat de la substance à 20 °C et 101,3 kPa
3.1. Smeltpunt	3.1. Point de fusion
3.2. Kookpunt	3.2. Point d'ébullition
3.3. Relatieve dichtheid	3.3. Densité relative
3.4. Dampspanning	3.4. Pression de vapeur
3.5. Oppervlaktespanning	3.5. Tension superficielle
3.6. Oplosbaarheid in water	3.6. Hydrosolubilité
3.8. Verdelingcoëfficiënt, n-octanol/water	3.8. Coefficient de partage n-octanol/eau
3.9. Vlampunt	3.9. Point d'éclair
3.10. Ontvlambaarheid	3.10. Inflammabilité
3.11. Ontploffingsgevaar	3.11. Danger d'explosion
3.12. Zelfontbrandingstemperatuur	3.12. Température d'auto-inflammation

3.13. Oxyderende eigenschappen**3.15. Korrelgrootte**

Stoffen die in de handel kunnen worden gebracht in een vorm waardoor gevaar van blootstelling via inhalatie bestaat, moeten worden getest om de verdeling van de deeltjesgrootte vast te stellen in de stof zoals die in de handel zal worden gebracht.

4. TOXICOLOGISCH ONDERZOEK**4.1. Acute toxiciteit**

Bij de in de punten 4.1.1. tot en met 4.1.3. bedoelde onderzoeken zijn voor andere stoffen dan gassen ten minste twee toedieningswegen vereist, waarvan er één oraal moet zijn. De keuze van de tweede toedieningsweg is afhankelijk van de aard van de stof en de waarschijnlijke weg waarlangs de mens daaraan zal worden blootgesteld. Voor gassen en vluchtige vloeistoffen geschiedt de toediening via inhalatie.

4.1.1. Orale toediening.

4.1.2. Toediening via inhalatie.

4.1.3. Dermale toediening.

4.1.5. Irritatie voor de huid.

4.1.6. Irritatie voor de ogen.

4.1.7. Sensibilisatie voor de huid.

4.2. Herhaalde toediening

De meest geschikte toedieningsweg moet worden gekozen, waarbij de keuze afhankelijk is van de waarschijnlijke weg waarlangs de mens aan de stof zal worden blootgesteld, de acute toxiciteit en de aard van de stof. Zijn er geen contra-indicaties, dan wordt gewoonlijk aan orale toediening de voorkeur gegeven.

4.2.1. Toxiciteit bij herhaalde toediening (28 dagen).

4.3. Overige effecten

4.3.1. Mutageniteit

De stof dient door middel van twee onderzoeken te worden onderzocht. Eén daarvan moet een bacteriologisch onderzoek (terugmutatieonderzoek), met en zonder metabolische activering, zijn. Het andere moet een niet-bacteriologisch onderzoek zijn om chromosoomafwijkingen of -schade op te sporen. Zijn er geen contra-indicaties, dan zou dit onderzoek in de regel *in vitro* moeten worden uitgevoerd, zowel met als zonder metabolische activering. Bij een positief resultaat bij één van beide onderzoeken moeten overeenkomstig de in bijlage V omschreven procedure verdere onderzoeken worden uitgevoerd.

4.3.2. Onderzoek naar de gevolgen van de toxiciteit voor de voortplanting (p.m.).

4.3.3. Vaststelling van het toxicokinetische gedrag van een stof voor zover dat kan worden afgeleid uit de gegevens van het basisdossier en andere informatie ter zake.

5. ECOTOXICOLOGISCH ONDERZOEK**5.1. Effecten op organismen**

5.1.1. Acute toxiciteit voor vissen.

5.1.2. Acute toxiciteit voor dafnia.

5.1.3. Groeiremmingsonderzoek bij algen.

5.1.6. Remmende werking op bacteriën

Indien de biologische afbraak wordt beïnvloed door de remmende werking van een stof op bacteriën, moet, voordat de biologische afbraak ter hand wordt genomen, een onderzoek naar de remmende werking op bacteriën worden uitgevoerd.

5.2. Degradatie

— biotisch,

— abiotisch :

indien de stof niet gemakkelijk biologisch afbreekbaar is, moet worden overwogen het volgende onderzoek te doen : hydrolyse in functie van de pH.

5.3. Screeningtest van de adsorptie/desorptie**3.13. Propriétés comburantes****3.15. Granulométrie**

Pour les substances qui sont mises sur le marché sous une forme créant un risque d'exposition par inhalation, il y a lieu de procéder à un essai pour déterminer la granulométrie de la substance telle qu'elle sera mise sur le marché.

4. ETUDES TOXICOLOGIQUES**4.1. Toxicité aiguë**

Pour les tests visés aux points 4.1.1. à 4.1.3., il est requis, pour les substances autres que les gaz, un minimum de deux voies d'administration, dont l'une devrait être la voie orale. Le choix de la deuxième voie d'administration dépendra de la nature de la substance et du type d'exposition auquel l'homme risque d'être soumis. Pour les gaz et les liquides volatils, l'administration devrait se faire par inhalation.

4.1.1. Administration orale.

4.1.2. Administration par inhalation.

4.1.3. Administration cutanée.

4.1.5. Irritation de la peau.

4.1.6. Irritation des yeux.

4.1.7. Sensibilisation de la peau.

4.2. Dose répétée

La voie d'administration devrait être la plus appropriée compte tenu du type d'exposition auquel l'homme risque d'être soumis, de la toxicité aiguë et de la nature de la substance. En l'absence de contre-indications, la voie orale est celle qui est habituellement préférée.

4.2.1. Toxicité par doses répétées (28 jours).

4.3. Autres effets

4.3.1. Mutagénèse

La substance devra être examinée au moyen de deux essais. L'un de ces essais devra être un essai bactériologique (essai de mutation réverse) avec et sans activation métabolique. Le second essai devra être un essai non bactériologique pour mettre en évidence les aberrations ou dommages chromosomiques. En l'absence de contre-indications, cet essai devrait normalement être effectué *in vitro*, avec et sans activation métabolique. En cas de résultat positif au cours de l'un des essais, des essais supplémentaires devraient être effectués selon la stratégie fixée à l'annexe V.

4.3.2. Dépistage de la toxicité liée à la reproduction (p.m.).

4.3.3. Evaluation du comportement toxicocinétique de la substance dans la mesure où il ressort des indications du dossier de base et des autres renseignements pertinents.

5. ETUDES ECOTOXICOLOGIQUES**5.1. Effets sur les organismes**

5.1.1. Toxicité aiguë pour les poissons.

5.1.2. Toxicité aiguë pour la daphnie.

5.1.3. Essai d'inhibition de croissance des algues.

5.1.6. Inhibition des bactéries

Dans les cas où la biodégradation peut être affectée par l'effet inhibitoire d'une substance sur les bactéries, un essai d'inhibition des bactéries devrait être effectué avant de procéder aux essais de biodégradation.

5.2. Dégradation :

— biotique,

— abiotique :

si la substance n'est pas facilement biodégradable, il convient de prendre en considération la nécessité d'effectuer l'essai suivant : hydrolyse en fonction du pH.

5.3. Essai préliminaire d'adsorption/désorption

6. MOGELIJKHEID OM DE STOF ONSCHADELIJK TE MAKEN

6.1. Bij industrie of ambacht

- 6.1.1. Mogelijkheden tot terugwinning.
 6.1.2. Mogelijkheden tot neutralisatie van negatieve effecten.
 6.1.3. Mogelijkheden tot vernietiging :
 — gecontroleerd lozen,
 — verbranden,
 — waterzuiveringsinstallatie,
 — overige.

6.2. Bij het grote publiek

- 6.2.1. Mogelijkheden tot terugwinning.
 6.2.2. Mogelijkheden tot neutralisatie van negatieve effecten.
 6.2.3. Mogelijkheden tot vernietiging :
 — gecontroleerd lozen,
 — verbranden,
 — waterzuiveringsinstallatie,
 — overige.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
 E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
 J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
 M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
 Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
 en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
 K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
 J. PEETERS

BIJLAGE VII B

**PUNTEN DIE IN HET IN ARTIKEL 2, § 2, 1° EN 3°, BEDOELDE
 TECHNISCH DOSSIER (BASISDOSSIER) MOETEN WORDEN OPGE-
 NOMEN**

Indien het technisch gezien niet mogelijk is of het wetenschappelijk gezien niet noodzakelijk lijkt deze gegevens te verstrekken, moeten de redenen daarvoor duidelijk worden vermeld en door de bevoegde instantie worden aanvaard.

De naam van de voor het uitvoeren van de onderzoeken verantwoordelijke instelling(en) dient te worden vermeld.

Naast de hieronder verlangde inlichtingen kunnen de Lid-Staten indien zij zulks noodzakelijk achten voor de beoordeling van het risico, eisen dat de kennisgever de volgende aanvullende informatie verstrekt :

- dampdruk,
- test inzake de acute toxiciteit voor dafnia.

**0. IDENTITEIT VAN DE FABRIKANT EN IDENTITEIT VAN DE
 KENNISGEVER; LIGGING VAN HET PRODUKTIEREIN**

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving als alleenvertegenwoordiger van de fabrikant is aangewezen : de identiteit en de adressen van de importeurs die de stof op het grondgebied van de Gemeenschap brengen.

6. POSSIBILITE DE RENDRE INOFFENSIVE LA SUBSTANCE

6.1. Niveau industrie/artisanat

- 6.1.1. Possibilité de recyclage.
 6.1.2. Possibilité de neutralisation des effets défavorables.
 6.1.3. Possibilité de destruction :
 — décharge contrôlée,
 — incinération,
 — station d'épuration des eaux,
 — autres.

6.2. Niveau grand public

- 6.2.1. Possibilité de recyclage.
 6.2.2. Possibilité de neutralisation des effets défavorables.
 6.2.3. Possibilité de destruction :
 — décharge contrôlée,
 — incinération,
 — station d'épuration des eaux,
 — autres.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
 E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
 J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé Publique,
 M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
 Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,

K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement
 J. PEETERS

ANNEXE VII B

**CARACTERISTIQUES FAISANT L'OBJET DU DOSSIER TECHNIQUE
 (DOSSIER DE BASE) VISE À L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 2, 1° ET 3°**

S'il n'est pas possible techniquement ou s'il ne paraît pas scientifiquement nécessaire de fournir une information, les raisons devront en être clairement indiquées et seront soumises à l'approbation des autorités compétentes.

Le nom du ou des organismes responsables de la réalisation des études sera indiqué.

Outre les informations requises ci-dessous, les Etats membres peuvent exiger, s'ils l'estiment nécessaire pour l'évaluation du risque, que le notifiant fournisse les informations supplémentaires suivantes :

- pression de vapeur,
- essai de toxicité aiguë pour la daphnie.

**0. IDENTITE DU FABRICANT ET IDENTITE DU NOTIFIANT;
 LOCALISATION DU LIEU DE PRODUCTION**

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, l'identité et l'adresse des importateurs qui importeront la substance dans la Communauté.

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.1. Benaming

- 1.1.1. Naam volgens de nomenclatuur van de Iupac.
- 1.1.2. Andere namen (gewone naam, handelsbenaming, afkorting).
- 1.1.3. CAS-nummer en CAS-benaming (indien beschikbaar).

1.2. Molecuulformule en structuurformule.

1.3. Samenstelling van de stof.

- 1.3.1. Zuiverheidsgraad (in %).
- 1.3.2. Aard van de onzuiverheden, met inbegrip van isomeren en bijprodukten.
- 1.3.3. Percentage van de voornaamste (significante) onzuiverheden.
- 1.3.4. Indien de stof een stabilisator, een inhibitor of andere additieven bevat, moeten hiervan de aard en het gehalte (ppm, %) worden vermeld.
- 1.3.5. Spectraalgegevens (UV, IR, NMR of massaspectrum).
- 1.3.6. HPLC, GC.

1.4. Detectie- en determinatiemethodes

Volledige beschrijving van de gebruikte methodes of bibliografische referenties inzake deze methodes.

Naast informatie over detectie- en determinatiemethodes moet informatie worden verschaft over de analysemethoden die de kennisgever bekend zijn en waarmee de aanwezigheid van een stof en de omzettingsprodukten daarvan na introductie in het milieu kan worden aangetoond en de rechtstreekse blootstelling van de mens kan worden vastgesteld.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.0. Productie.

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die voor mens en milieu aan het productieproces kunnen zijn verbonden. Precieze details over het productieproces, met name commercieel gevoelige details, worden niet vereist.

- 2.0.1. Bij de productie toegepast(e) technologisch(e) procédé(s).
- 2.0.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van de productie :
 - werkomgeving,
 - milieu.

2.1. Beoogde gebruiksdoeleinden

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die, gelet op de beoogde/te verwachten gebruiksdoeleinden, voor mens en milieu aan de stoffen kunnen zijn verbonden.

- 2.1.1. Aard van het gebruik : beschrijving van de functie en de nagestreefde effecten.
 - 2.1.1.1. Technologisch(e) procédé(s) waarbij de stof wordt gebruikt (voor zover bekend).
 - 2.1.1.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van het gebruik (voor zover bekend) :
 - werkomgeving,
 - milieu.
 - 2.1.1.3. Vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht : stof, preparaat, produkt.
 - 2.1.1.4. Concentratie van de stof in preparaten en produkten die in de handel worden gebracht (voor zover bekend).
- 2.1.2. Toepassingsgebieden met geraamde onderverdeling :
 - industrie,
 - landbouwers en ambachtslieden,
 - gebruik door het grote publiek.

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.1. Nom

- 1.1.1. Noms suivant la nomenclature de l'UICPA.
- 1.1.2. Autres noms (nom comun, nom commercial, abréviation).
- 1.1.3. Numéro et dénomination CAS (si disponibles).

1.2. Formule brute et formule développée

1.3. Composition de la substance

- 1.3.1. Pureté en pourcentage (%).
- 1.3.2. Nature des impuretés, y compris les isomères et les sous-produits.
- 1.3.3. Pourcentage des impuretés principales (significatives).
- 1.3.4. Si la substance contient un stabilisant ou un inhibiteur ou d'autres additifs, en préciser la nature, l'ordre de grandeur : ppm; . %.
- 1.3.5. Données spectrales (UV, IR, RMN ou spectre de masse).
- 1.3.6. HPLC, GC.

1.4. Méthodes de détection et de détermination

Description complète des méthodes utilisées ou indication des références bibliographiques.

Outre l'indication des méthodes de détection et de dosage, le notifiant doit présenter les méthodes d'analyse dont il a connaissance et qui permettent de suivre la substance et ses produits de transformation après leur introduction dans l'environnement ou de déterminer l'exposition humaine directe à la substance.

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE.

2.0. Production.

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que le processus de production peut présenter pour l'homme et l'environnement. Les détails précis concernant le processus de fabrication, et notamment ceux qui sont particulièrement sensibles du point de vue commercial, ne sont pas exigés.

- 2.0.1. Procédés technologiques utilisés pour la production.
- 2.0.2. Estimation de l'exposition relative à la production :
 - milieu de travail,
 - environnement.

2.1. Utilisations envisagées.

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que les substances, compte tenu des utilisations envisagées/prévisibles, peuvent présenter pour l'homme et l'environnement.

- 2.1.1. Types d'utilisation : description de la fonction et des effets recherchés.
 - 2.1.1.1. Procédé(s) technologique(s) relatif(s) à l'utilisation de la substance [lorsqu'il(s) est/sont connu(s)].
 - 2.1.1.2. Prévision(s) de l'exposition relative(s) à l'utilisation [lorsqu'elle(s) est/sont connue(s)].
 - milieu de travail,
 - environnement.
 - 2.1.1.3. Forme sous laquelle la substance est mise sur le marché : substance, préparation, produit.
 - 2.1.1.4. Concentration de la substance dans les préparations ou les produits mis sur le marché (lorsqu'elle est connue).
- 2.1.2. Domaines d'application avec ventilation approximative :
 - industries,
 - professionnels de l'agriculture et de l'artisanat,
 - utilisation par le grand public.

2.1.3. Voor zover bekend en indien van toepassing, de identiteit van de afnemers van de stof.

2.2. Geraamde produktie en/of invoer voor elk der beoogde gebruiksdoeleinden of -sectoren.

2.2.1. Totale produktie en/of invoer in ton per jaar :

- in het eerste kalenderjaar,
- in de volgende kalenderjaren.

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving als de alleenvertegenwoordiger van de fabrikant is aangewezen, moet deze informatie voor elk van de onder rubriek 0 bedoelde importeurs worden verschaft.

2.2.2. Produktie en/of invoer, opgesplitst volgens de punten 2.1.1. en 2.1.2. (in %) :

- in het eerste kalenderjaar,
- in de volgende kalenderjaren.

2.3. Aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen.

2.3.1. — bij behandeling,

2.3.2. — bij opslag,

2.3.3. — bij vervoer,

2.3.4. — bij brand (aard van de verbrandings- of pyrolysegassen, indien dit, gezien het beoogde gebruik, noodzakelijk is).

2.3.5. Andere gevaren, met name chemische reactie met water.

2.4. Noodmaatregelen in geval van incidenteel vrijkomen.

2.5. Noodmaatregelen in geval van ongevallen met personen (bij voorbeeld vergiftiging).

2.6. Verpakking.

3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF.

3.0. Toestand van de stof bij 20° C en 101,3 kPa.

3.1. Smeltpunt.

3.2. Kookpunt.

3.6. Oplosbaarheid in water.

3.8. Verdelingscoëfficiënt n-octanol/water.

3.9. Vlampunt.

3.10. Ontvlambaarheid.

4. TOXICOLOGISCH ONDERZOEK.

4.1. Acute toxiciteit

Bij de in de punten 4.1.1. en 4.1.2. bedoelde onderzoeken volstaat één toedieningsweg. Andere stoffen dan gassen moeten door middel van orale toediening worden onderzocht. Gassen moeten door inhalatie worden onderzocht.

4.1.1. Orale toediening.

4.1.2. Toediening via inhalatie.

4.1.5. Irritatie voor de huid.

4.1.6. Irritatie voor de ogen.

4.1.7. Sensibilisatie voor de huid.

4.3. Overige effecten.

4.3.1. Mutageniteit.

De stof dient door middel van een bacteriologisch onderzoek (terugmutatieonderzoek) te worden onderzocht, met en zonder metabolische activering.

2.1.3. Si approprié, identité des clients (lorsqu'elle est connue).

2.2. Production et/ou importation prévue pour chacune des utilisations ou des domaines d'utilisation envisagés.

2.2.1. Production et/ou importation globale, exprimée en tonnes, par an :

- la première année civile,
- les années civiles suivantes.

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, cette information doit être donnée pour chacun des importateurs identifiés au point 0.

2.2.2. Production et/ou importation ventilée suivant les points 2.1.1. et 2.1.2. et exprimée en pourcentage :

- la première année civile,
- les années civiles suivantes.

2.3. Méthodes et précautions recommandées relatives :

2.3.1. à la manipulation,

2.3.2. — au stockage,

2.3.3. — au transport,

2.3.4. — à l'incendie (nature des gaz de combustion ou pyrolyse lorsque les usages envisagés le justifient).

2.3.5. Autres dangers, notamment réaction chimique avec l'eau.

2.4. Mesures d'urgence en cas de dispersion accidentelle.

2.5. Mesures d'urgence en cas de dommages corporels (par exemple empoisonnement).

2.6. Emballage.

3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE.

3.0. Etat de la substance à 20° C et 101,3 kPa.

3.1. Point de fusion.

3.2. Point d'ébullition.

3.6. Hydrosolubilité.

3.8. Coefficient de partage n-octanol/eau.

3.9. Point d'éclair.

3.10. Inflammabilité.

4. ETUDES TOXICOLOGIQUES.

4.1. Toxicité aiguë.

Pour les tests visés aux points 4.1.1. et 4.1.2., une seule voie d'administration suffit. Les substances autres que les gaz devraient être testées par administration orale. Les gaz devraient être testés par inhalation.

4.1.1. Administration orale.

4.1.2. Administration par inhalation.

4.1.5. Irritation de la peau.

4.1.6. Irritation des yeux.

4.1.7. Sensibilisation de la peau.

4.3. Autres effets.

4.3.1. Mutagénèse.

La substance devrait être examinée au moyen d'un essai bactériologique (essai de mutation réverse) avec et sans activation métabolique.

5. ECOTOXICOLOGISCH ONDERZOEK.

5.2. **Degradatie.**

— biotisch.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPODe Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTEDe Minister van Volksgezondheid,
M. COLLADe Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMETDe Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTENDe Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS**BIJLAGE VII C**GEGEVENS DIE IN HET IN ARTIKEL 2, § 2, 2°,
BEDOELDE TECHNISCH DOSSIER (BASISDOSSIER)
MOETEN WORDEN OPGENOMEN

Indien het technisch gezien niet mogelijk is of wetenschappelijk gezien niet noodzakelijk lijkt deze gegevens te verstrekken, moeten de redenen daarvoor duidelijk worden vermeld en aan de bevoegde instanties ter goedkeuring worden voorgelegd.

De naam van de voor het uitvoeren van de onderzoeken verantwoordelijke instelling(en) dient te worden vermeld.

O. IDENTITEIT VAN DE FABRIKANT EN IDENTITEIT VAN DE KENNISGEVER, INDIEN DEZE NIET DEZELFDE ZIJN; LIGGING VAN HET PRODUKTIEREIN

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving als alleenvertegenwoordiger van de fabrikant is aangewezen : de identiteit en de adressen van de importeurs die de stof in de Gemeenschap zullen invoeren.

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.1. **Benaming**

1.1.1. Naam volgens de nomenclatuur van de IUPAC.

1.1.2. Andere namen (gewone naam, handelsbenaming, afkorting).

1.1.3. CAS-nummer en CAS-benaming (indien beschikbaar).

1.2. **Molecuulformule en structuurformule**1.3. **Samenstelling van de stof**

1.3.1. Zuiverheidsgraad (in %).

1.3.2. Aard van de onzuiverheden, met inbegrip van isomeren en bijproducten.

1.3.3. Percentage van de voornaamste (significante) onzuiverheden.

1.3.4. Indien de stof een stabilisator of een inhibitor of andere additieven bevat, moeten hiervan de aard en het gehalte (ppm, %) worden vermeld.

1.3.5. Spectraalgegevens (UV, IR, NMR of massaspectrum).

1.3.6. HPLC, GC.

5. ETUDES ECOTOXICOLOGIQUES.

5.2. **Dégradation.**

— biotique.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPOLe Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTELe Ministre de la Santé publique,
M. COLLALa Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMETLe Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTENLe Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS**ANNEXE VII C**CARACTERISTIQUES FAISANT L'OBJET DU DOSSIER TECHNIQUE
(DOSSIER DE BASE) VISE A L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 2, 2°

S'il n'est pas possible techniquement ou s'il ne paraît pas scientifiquement nécessaire de fournir une information, les raisons devront en être clairement indiquées et seront soumises à l'approbation des autorités compétentes.

Le nom du ou des organismes responsables de la réalisation des études sera indiqué.

O. IDENTITE DU FABRICANT ET IDENTITE DU NOTIFIANT LORSQU'ILS NE SONT PAS LES MEMES; LOCALISATION DU LIEU DE PRODUCTION

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, l'identité et l'adresse des importateurs qui importeront la substance dans la Communauté.

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.1. **Nom**

1.1.1. Noms suivant la nomenclature de l'UICPA.

1.1.2. Autres noms (nom commun, nom commercial, abréviation).

1.1.3. Numéro et dénomination CAS (si disponibles).

1.2. **Formule brute et formule développée**1.3. **Composition de la substance**

1.3.1. Pureté en pourcentage (%).

1.3.2. Nature des impuretés, y compris les isomères et les sous-produits.

1.3.3. Pourcentage des impuretés principales (significatives).

1.3.4. Si la substance contient un stabilisant ou un inhibiteur ou d'autres additifs, en préciser la nature, l'ordre de grandeur : ppm; %.

1.3.5. Données spectrales (UV, IR, RMN ou spectre de masse).

1.3.6. HPLC, GC.

1.4. Detectie- en determinatiemethodes

Volledige beschrijving van de gebruikte methodes of relevante bibliografische referenties.

Naast informatie over detectie- en determinatiemethodes moet informatie worden verschaft over de analysemethodes die de kennisgever bekend zijn en waarmee de aanwezigheid van een stof en de omzettingen daarvan na introductie in het milieu kan worden aangetoond en de rechtstreekse blootstelling van de mens kan worden vastgesteld.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF**2.0. Productie**

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die voor mens en milieu aan het productieproces kunnen vastzitten. Precieze details over het productieproces, met name commercieel gevoelige details, worden niet vereist.

2.0.1. Bij de productie toegepast(e) technologisch(e) procédé(s).

2.0.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van de productie :

- werkomgeving,
- milieu.

2.1. Beoogde gebruiksdoeleinden

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die, gelet op de beoogde/te verwachten gebruiksdoeleinden, voor mens en milieu aan de stoffen kunnen vastzitten.

2.1.1. Aard van het gebruik : beschrijving van de functie en de nagestreefde effecten.

2.1.1.1. Technologisch(e) procédé(s) waarbij de stof wordt gebruikt (voor zover bekend).

2.1.1.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van het gebruik (voor zover bekend) :

- werkomgeving,
- milieu.

2.1.1.3. Vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht : stof, preparaat, produkt.

2.1.1.4. Concentratie van de stof in preparaten en produkten die in de handel worden gebracht (voor zover bekend).

2.1.2. Toepassingsgebieden met geraamde onderverdeling :

- industrie,
- landbouwers en ambachtslieden,
- gebruik door het grote publiek.

2.1.3. Voor zover bekend en indien van toepassing, de identiteit van de afnemers van de stof.

2.2. Geraamde productie en/of invoer voor elk der beoogde gebruiksdoeleinden of -sectoren.

2.2.1. Totale productie en/of invoer in ton per jaar :

- in het eerste kalenderjaar,
- in de volgende kalenderjaren.

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving als alleenvertegenwoordiger van de fabrikant is aangewezen, moet deze informatie voor elk van de in rubriek O bedoelde importeurs worden verschaft.

2.2.2. Productie en/of invoer, opgesplitst volgens de punten 2.1.1. en 2.1.2. (in %) :

- in het eerste kalenderjaar,
- in de volgende kalenderjaren.

2.3. Aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen

2.3.1. — bij behandeling,

2.3.2. — bij opslag,

2.3.3. — bij vervoer,

2.3.4. — bij brand (aard van de verbrandings- of pyrolysegassen, indien dit, gezien het beoogde gebruik, noodzakelijk is).

2.3.5. Andere gevaren, met name chemische reactie met water.

2.4. Noodmaatregelen in geval van incidenteel vrijkomen

2.5. Noodmaatregelen in geval van ongevallen met personen (bij voorbeeld vergiftiging)

2.6. Verpakking**3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF****3.0. Toestand van de stof bij 20° C en 101,3 kPa****1.4. Méthodes de détection et de détermination**

Description complète des méthodes utilisées ou indication des références bibliographiques.

Outre l'indication des méthodes de détection et de dosage, le notifiant doit présenter les méthodes d'analyse dont il a connaissance et qui permettent de suivre la substance et ses produits de transformation après leur introduction dans l'environnement ou de déterminer l'exposition humaine directe à la substance.

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE**2.0. Production**

Les informations fournies dans cette section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que le processus de production peut présenter pour l'homme et pour l'environnement. Les détails précis concernant le processus de fabrication, et notamment ceux qui sont particulièrement sensibles du point de vue commercial, ne sont pas exigés.

2.0.1. Procédé(s) technologique(s) utilisé(s) pour la production.

2.0.2. Estimation de l'exposition relative à la production :

- milieu de travail,
- environnement.

2.1. Utilisations envisagées

Les informations fournies dans cette section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer, de manière approximative mais réaliste, les risques que les substances, compte tenu des utilisations envisagées/prévisibles, peuvent présenter pour l'homme et pour l'environnement.

2.1.1. Types d'utilisation : description de la fonction et des effets recherchés.

2.1.1.1. Procédé(s) technologique(s) relatif(s) à l'utilisation de la substance [lorsqu'il(s) est/sont connu(s)].

2.1.1.2. Prévision(s) de l'exposition relative(s) à l'utilisation [lorsqu'elle(s) est/sont connue(s)] :

- milieu de travail,
- environnement.

2.1.1.3. Forme sous laquelle la substance est mise sur le marché : substance, préparation, produit.

2.1.1.4. Concentration de la substance dans les préparations ou les produits mis sur le marché (lorsqu'elle est connue).

2.1.2. Domaines d'application avec ventilation approximative :

- industries,
- professionnels de l'agriculture et de l'artisanat,
- utilisation par le grand public.

2.1.3. Si approprié, identité des clients (lorsqu'elle est connue).

2.2. Production et/ou importation prévue pour chacune des utilisations ou des domaines d'utilisation envisagés

2.2.1. Production et/ou importation globale, exprimée en tonnes, par an :

- la première année civile,
- les années civiles suivantes.

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, cette information doit être donnée pour chacun des importateurs identifiés au point O.

2.2.2. Production et/ou importation ventilée suivant les points 2.1.1. et 2.1.2. et exprimée en pourcentage :

- la première année civile,
- les années civiles suivantes.

2.3. Méthodes et précautions recommandées relatives :

2.3.1. — à la manipulation,

2.3.2. — au stockage,

2.3.3. — au transport,

2.3.4. — à l'incendie (nature des gaz de combustion ou pyrolyse lorsque les usages envisagés le justifient).

2.3.5. Autres dangers, notamment réaction chimique avec l'eau.

2.4. Mesures d'urgence en cas de dispersion accidentelle

2.5. Mesures d'urgence en cas de dommages corporels (par exemple empoisonnement)

2.6. Emballage**3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE****3.0. Etat de la substance à 20° C et 101,3 kPa**

3.9. Vlampunt**3.10 Ontvlambaarheid****4. TOXICOLOGISCH ONDERZOEK****4.1. Acute toxiciteit**

Eén toedieningsweg is voldoende. Andere stoffen dan gassen moeten door middel van orale toediening worden onderzocht. Gassen moeten middels inhalatie worden onderzocht.

4.1.1. Orale toediening.**4.1.2. Toediening via inhalatie.**

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

BIJLAGE VII D

SPECIFIEKE BEPALINGEN BETREFFENDE HET TECHNISCHE DOSSIER (« BASISDOSSIER ») DAT IS OPGENOMEN IN DE IN ARTIKEL 2, § 6, BEDOELDE KENNISGEVINGEN

A. In de zin van deze bijlage is :

- een « homopolymeer » : een polymeer dat bestaat uit slechts één soort monomeereenheden;
- een « copolymeer » : een polymeer dat bestaat uit meer dan één soort monomeereenheden;
- een « polymeer waarvoor een beperkt testpakket aanvaardbaar is » of « BTP-polymeer » : een polymeer dat voldoet aan de onder punt C.2 vastgestelde criteria;
- een « polymeerfamilie » : een groep polymeren (homopolymeren of copolymeren) met een uiteenlopend aantal gemiddeld molecuulgewicht of een uiteenlopende samenstelling die het gevolg is van verschillende verhoudingen tussen de soorten monomeereenheden; de verschillen in het aantal gemiddeld molecuulgewicht of in samenstelling worden niet bepaald door onbedoelde procesgebonden fluctuaties, maar door opzettelijke wijzigingen in de procesomstandigheden, waarbij het proces zelf gelijk blijft;
- « Mn » : het aantal gemiddeld molecuulgewicht;
- « M » : het molecuulgewicht.

B. Het familieconcept.

Om onnodige tests te vermijden kunnen polymeren in families worden ingedeeld.

Het uitgangspunt is dat representatieve leden van een familie worden getest, waarbij :

- voor homopolymeren Mn variabel is, of
- voor copolymeren de samenstelling variabel is en Mn ongeveer constant, of
- voor copolymeren met Mn > 1000, Mn variabel is en de samenstelling ongeveer constant.

3.9. Point d'éclair**3.10 Inflammabilité****4. ETUDES TOXICOLOGIQUES****4.1. Toxicité aiguë**

Une seule voie d'administration suffit. Les substances autres que les gaz devraient être testées par administration orale. Les gaz devraient être testés par inhalation.

4.1.1. Administration orale.**4.1.2. Administration par inhalation.**

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,

K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

ANNEXE VII D

DISPOSITIONS SPECIFIQUES RELATIVES AUX DOSSIERS TECHNIQUES (« NIVEAU DE BASE ») CONTENUS DANS LES NOTIFICATIONS VISEES A L'ARTICLE 2, § 6

A. Aux fins de la présente annexe, on entend par :

- « homopolymère » : un polymère constitué d'un seul type d'unité monomère;
- « copolymère » : un polymère constitué de plusieurs types d'unités monomères;
- « polymère qui peut être soumis à une batterie d'essais réduite » ou « polymère BER », un polymère qui répond aux critères fixés au point C.2;
- « famille de polymères » : un groupe de polymères (homopolymères ou copolymères) de poids moléculaires moyens en nombre différents ou de compositions différentes en raison des différentes proportions d'unités monomères. La différence de poids moléculaire moyen en nombre ou de composition ne résulte pas des fluctuations accidentelles liées au processus, mais par des modifications délibérées des conditions du processus, celui-ci restant inchangé,
- « Mn » : le poids moléculaire moyen en nombre;
- « M » : le poids moléculaire.

B. Approche par famille

Afin d'éviter les essais non nécessaires, il est possible de regrouper les polymères en familles.

L'idée consiste à tester des membres représentatifs d'une famille ayant :

- un Mn variable pour les homopolymères ou
- une composition variable avec un Mn approximativement constant pour les copolymères ou
- pour un Mn supérieur à 1000, un Mn variable avec une composition plus ou moins constante pour les copolymères

Wanneer in bepaalde gevallen de effecten bij de representatieve leden over het Mn- of samenstellingstraject uiteenlopen, zijn aanvullende tests bij andere representatieve leden vereist.

C. Informatie die in het in art. 2, § 6 bedoelde technisch dossier moet worden opgenomen.

Indien het technisch gezien niet mogelijk is of wetenschappelijk gezien niet noodzakelijk lijkt deze gegevens te verstrekken, moeten de redenen daarvoor duidelijk worden vermeld en door de bevoegde instantie worden aanvaard.

Bij de beoordeling van de eigenschappen van het polymeer kan rekening worden gehouden met beschikbare adequate informatie die over de eigenschappen van het monomeer of de monomeren beschikbaar is.

Onverminderd de bepalingen van artikel 3, § 1 van dit besluit moeten de tests, wanneer er door de bevoegde internationale instanties erkende en aanbevolen methoden bestaan, volgens deze methoden worden uitgevoerd.

De naam van de voor het uitvoeren van de onderzoeken verantwoordelijke instellingen dient te worden vermeld.

C1. POLYMEREN MET EEN STANDAARD-TESTPAKKET

C.1.1. *Polymeren die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van 1 ton of meer per jaar of 5 ton of meer in totaal*

Naast de in artikel 2, § 1, bedoelde en in bijlage VII A gespecificeerde informatie en tests moet de volgende voor polymeren specifieke informatie worden verstrekt :

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.2.1. Aantalgemiddeld molecuulgewicht

1.2.2. Molecuulgewichtsverdeling (MGV)

1.2.3. Identiteit en concentratie van de uitgangsmonomeren en -stoffen die in het polymeer worden gebonden

1.2.4. Vermelding van de eindgroepen en de identiteit en frequentie van reactieve functionele groepen

1.3.2.1. Identiteit van monomeren die niet hebben gereageerd.

1.3.3.1. Percentage van de monomeren die niet hebben gereageerd.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.1.1.5. Indien het de opzet is dat het polymeer in het milieu kan worden afgebroken : relevante informatie hierover

3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF

3.6.1. Extraheerbaarheid met water

Onverminderd het bepaalde in art. 5, § 2, II, van dit besluit, kan in sommige gevallen nader onderzoek worden vereist, bij voorbeeld op het gebied van :

— de stabiliteit onder invloed van licht, indien het polymeer niet specifiek voor licht gestabiliseerd is,

— de extraheerbaarheid op lange termijn (uitloogtest); afhankelijk van de resultaten van deze test kan per geval relevant onderzoek van de uitloogvloeistof worden vereist.

C.1.2. *Polymeren die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van minder dan 1 ton per jaar of minder dan 5 ton in totaal, maar ≥ 100 kg per jaar of ≥ 500 kg in totaal*

Naast de in artikel 2, § 2, 1° en 3° bedoelde en in bijlage VII B gespecificeerde informatie en tests moet de volgende voor polymeren specifieke informatie worden verstrekt :

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.2.1. Aantalgemiddeld molecuulgewicht

1.2.2. Molecuulgewichtsverdeling (MGV)

1.2.3. Identiteit en concentratie van de uitgangsmonomeren en -stoffen die in het polymeer worden gebonden

1.2.4. Vermelding van de eindgroepen en de identiteit en frequentie van reactieve functionele groepen

1.3.2.1. Identiteit van monomeren die niet hebben gereageerd

1.3.3.1. Percentage van de monomeren die niet hebben gereageerd

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.1.1.5. Indien het de opzet is dat het polymeer in het milieu kan worden afgebroken : relevante informatie hierover

3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF

3.6.1. Extraheerbaarheid met water

Dans certains cas, lorsque les effets observés sur des membres représentatifs diffèrent en fonction de la gamme de Mn ou de la composition, des essais complémentaires sur d'autres membres représentatifs sont nécessaires.

C. Informations requises pour le dossier technique visé à l'article 2, § 6

S'il n'est pas possible techniquement ou s'il ne paraît pas scientifiquement nécessaire de fournir une information, les raisons devront être clairement indiquées et seront soumises à l'approbation des autorités compétentes.

Les informations pertinentes disponibles sur les propriétés du ou des monomères peuvent être prises en compte pour l'évaluation des propriétés du polymère.

Sans préjudice des dispositions de l'article 3, § 1^{er} du présent arrêté, les essais doivent être effectués à l'aide de méthodes reconnues et recommandées par les organismes internationaux compétents lorsque de telles recommandations existent.

Le nom du ou des organismes responsables de la réalisation des études sera indiqué.

C.1. POLYMERES SOUMIS A UNE BATTERIE D'ESSAIS TYPE

C.1.1. *Polymères placés sur le marché communautaire dans des quantités supérieures ou égales à une tonne par an ou dans des quantités totales supérieures ou égales à cinq tonnes*

En plus des informations et des essais visés à l'article 2, § 1^{er} figurant à l'annexe VII A, les informations suivantes propres aux polymères sont requises :

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.2.1. Poids moléculaire moyen en nombre

1.2.2. Distribution de poids moléculaire (DPM)

1.2.3. Identité et concentration des monomères et des substances de départ qui se trouveront sous forme liée dans le polymère

1.2.4. Indication des groupes terminaux et identité et fréquence des groupes fonctionnels réactifs

1.3.2.1. Identité des monomères sous forme non réagie

1.3.3.1. Pourcentage des monomères sous forme non réagie

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.1.1.5. Déclaration accompagnée des informations pertinentes, si le polymère a été conçu pour être biodégradable

3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE

3.6.1. Extractivité par l'eau

Sans préjudice de l'article 5, § 2, II, du présent arrêté, des essais supplémentaires peuvent être requis dans certains cas, par exemple :

— la stabilité à la lumière si le polymère n'est pas spécifiquement conçu pour cela,

— l'extractivité à long terme (essai de lixiviation); en fonction des résultats correspondants, des essais appropriés sur le lixiviat peuvent être requis au cas par cas.

C.1.2. *Polymères placés sur le marché communautaire dans des quantités inférieures à une tonne par an ou dans des quantités totales inférieures à cinq tonnes, mais supérieures ou égales à 100 kilogrammes par an ou dans des quantités totales supérieures ou égales à 500 kilogrammes*

En plus des informations et des essais visés à l'article 2, § 2, 1° et 3° figurant à l'annexe VII B, les informations suivantes propres aux polymères sont requises :

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.2.1. Poids moléculaire moyen en nombre

1.2.2. Distribution de poids moléculaire (DPM)

1.2.3. Identité et concentration des monomères et des substances de départ qui se trouveront sous forme liée dans le polymère

1.2.4. Indication des groupes terminaux et identité et fréquence des groupes fonctionnels réactifs

1.3.2.1. Identité des monomères sous forme non réagie

1.3.3.1. Pourcentage des monomères sous forme non réagie

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.1.1.5. Déclaration contenant les informations pertinentes, si le polymère a été conçu pour être biodégradable

3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE

3.6.1. Extractivité par l'eau

C.1.3. *Polymere die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van minder dan 100 kg per jaar of minder dan 500 kg in totaal*

Naast de in artikel 2, § 2, 2° bedoelde en in bijlage VII C gespecificeerde informatie en tests moet de volgende voor polymeren specifieke informatie worden verstrekt;

1. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.2.1. Aantalgemiddeld molecuulgewicht

1.2.2. Molecuulgewichtsverdeling (MGV)

1.2.3. Identiteit en concentratie van de uitgangsmoederen en -stoffen die in het polymeer worden gebonden

1.2.4. Vermelding van de eindgroepen en de identiteit en frequentie van reactieve functionele groepen

1.3.2.1. Identiteit van monomeren die niet hebben gereageerd

1.3.3.1. Percentage van de monomeren die niet hebben gereageerd

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.1.1.5. Indien het de opzet is dat het polymeer in het milieu kan worden afgebroken : relevante informatie hierover

C.2. POLYMEREN WAARVOOR EEN BEPERKT TESTPAKKET AANVAARDBAAR IS

Onder bepaalde voorwaarden kan het basis-testpakket voor polymeren worden beperkt.

Stoffen met een hoog aantalgemiddeld molecuulgewicht, een laag gehalte aan laag moleculaire stoffen en een slechte oplosbaarheid/extraheerbaarheid worden als niet biologisch beschikbaar beschouwd. Om te bepalen voor welke polymeren een beperkt testpakket aanvaardbaar is, worden derhalve de volgende criteria gehanteerd :

— voor niet gemakkelijk afbreekbare polymeren die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van 1 ton of meer per jaar of 5 ton of meer in totaal, worden om te bepalen voor welke polymeren een beperkt testpakket aanvaardbaar is, de volgende criteria gehanteerd :

I. Een hoog aantalgemiddeld molecuulgewicht (Mn) ⁽¹⁾

II. Een extraheerbaarheid in water (3.6.1.) van minder dan 10 mg/l, bijdragen van additieven en verontreinigingen niet meegerekend;

III. Minder dan 1 % met M < 1000; hierbij gaat het alleen om monomeren en moleculen (bestanddelen) die rechtstreeks hiervan zijn afgeleid, en niet om andere bestanddelen als additieven of verontreinigingen.

Indien aan alle criteria is voldaan, wordt het polymeer beschouwd als een polymeer waarvoor een beperkt testpakket aanvaardbaar is;

— Voor niet gemakkelijk afbreekbare polymeren die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van minder dan 1 ton per jaar of minder dan 5 ton in totaal, is het voldoende om het polymeer te beschouwen als een polymeer waarvoor een beperkt testpakket aanvaardbaar is, als aan de criteria I en II wordt voldaan.

Indien met de daartoe aangewezen tests niet kan worden bewezen dat aan de criteria wordt voldaan, moet de kennisgever dit op een andere manier aantonen.

Onder bepaalde omstandigheden kan toxicologisch en ecotoxicologisch onderzoek worden vereist.

C.2.1. *Polymere die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van 1 ton of meer per jaar of 5 ton of meer in totaal*

0. IDENTITEIT VAN DE FABRIKANT EN IDENTITEIT VAN DE KENNISGEVER; LIGGING VAN HET PRODUKTIEREIN

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als enige vertegenwoordiger van de fabrikant : de identiteit en de adressen van de importeurs die de stof op het grondgebied van de Gemeenschap brengen.

I. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.1. Benaming

1.1.1. Naam volgens de nomenclatuur van de IUPAC

1.1.2. Andere namen (gewone naam, handelsbenaming, afkorting)

1.1.3. CAS-nummer en CAS-benaming (indien beschikbaar)

1.2. Molecuulformule en structuurformule

1.2.1. Aantalgemiddeld molecuulgewicht

1.2.2. Molecuulgewichtsverdeling (MGV)

C.1.3. *Polymères placés sur le marché communautaire dans des quantités inférieures à 100 kilogrammes par an ou dans des quantités totales inférieures à 500 kilogrammes*

En plus des informations et des essais visés à l'article 2, § 2, 2° figurant à l'annexe VII C, les informations suivantes propres aux polymères sont requises :

1. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.2.1. Poids moléculaire moyen en nombre

1.2.2. Distribution de poids moléculaire (DPM)

1.2.3. Identité et concentration des monomères et des substances de départ qui se trouveront sous forme liée dans le polymère

1.2.4. Indication des groupes terminaux et identité et fréquence des groupes fonctionnels réactifs

1.3.2.1. Identité des monomères sous forme non réagie

1.3.3.1. Pourcentage des monomères sous forme non réagie

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.1.1.5. Déclaration contenant les informations pertinentes, si le polymère a été conçu pour être biodégradable

C.2. POLYMERES QUI POURRONT ETRE SOUMIS A UNE BATTERIE D'ESSAIS REDUITE

Dans certaines conditions, la batterie d'essais pour le niveau de base pour les polymères peut être réduite.

Les substances ayant un haut poids moléculaire moyen en nombre, une faible teneur en espèces à bas poids moléculaire et une faible solubilité/extractivité seront considérées comme non biodisponibles. Par conséquent, les critères suivants seront utilisés pour déterminer quels sont les polymères qui pourront être soumis à une batterie d'essais réduite :

— pour les polymères non facilement dégradables et qui sont placés sur le marché communautaire dans des quantités supérieures ou égales à une tonne par an ou dans des quantités totales supérieures ou égales à cinq tonnes, les critères suivants définissent les polymères qui pourront être soumis à une batterie d'essais réduite :

I. Haut poids moléculaire moyen en nombre (Mn) ⁽¹⁾

II. Extractivité par l'eau (point 3.6.1) inférieure à 10 milligrammes par litre excluant toute contribution d'additifs et d'impuretés;

III. Moins de 1 % avec un M inférieur 1000; le pourcentage s'applique uniquement aux molécules (composants) formées directement à partir des monomères et aux monomères eux-mêmes, à l'exclusion d'autres composants, par exemple des additifs ou des impuretés.

Si toutes les conditions sont remplies, le polymère est considéré comme un polymère qui peut être soumis à une batterie d'essais réduite.

— Dans le cas de polymères non facilement dégradables placés sur le marché communautaire dans des quantités inférieures à une tonne par an ou dans des quantités totales inférieures à cinq tonnes, il suffit que les critères I et II soient satisfaits pour considérer que le polymère est un polymère qui peut être soumis à une batterie d'essais réduite.

S'il n'est pas possible de prouver la conformité aux critères à l'aide des essais imposés, le notifiant doit démontrer cette conformité par d'autres moyens.

Dans certaines circonstances, des essais de toxicologie et d'écotoxicologie peuvent être requis.

C.2.1. *Polymères placés sur le marché communautaire dans des quantités supérieures ou égales à une tonne par an ou dans des quantités totales supérieures ou égales à cinq tonnes*

0. IDENTITE DU FABRICANT ET IDENTITE DU NOTIFIANT; LOCALISATION DU LIEU DE PRODUCTION

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, l'identité et l'adresse des importateurs qui importeront la substance dans la Communauté.

I. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.1. Nom

1.1.1. Nom suivant la nomenclature de l'UICPA

1.1.2. Autres noms (nom commun, non commercial, abréviation)

1.1.3. Numéro et dénomination CAS (si disponibles)

1.2. Formule brute et développée

1.2.1. Poids moléculaire moyen en nombre

1.2.2. Distribution de poids moléculaire (DPM)

(1) De instantie die de kennisgeving heeft ontvangen, besluit op eigen verantwoordelijkheid of een polymeer al dan niet voldoet aan dit criterium.

(1) Les autorités compétentes recevant la notification doivent décider sous leur propre responsabilité si ce critère est ou non satisfait pour un polymère.

1.2.3. Identiteit en concentratie van de uitgangsmoermoneren en -stoffen die in het polymeer worden gebonden

1.2.4. Vermelding van de eindgroepen en de identiteit en frequentie van reactieve functionele groepen

1.3. Samenstelling van de stof

1.3.1. Zuiverheidsgraad (in %)

1.3.2. Aard van de onzuiverheden, met inbegrip van bijprodukten

1.3.2.1. Identiteit van monomeren die niet hebben gereageerd

1.3.3. Percentage van de voornaamste (significante) onzuiverheden

1.3.3.1. Percentage van de monomeren die niet hebben gereageerd

1.3.4. Indien de stof een stabilisator, een inhibitor of andere additieven bevat, moeten hiervan de aard en het gehalte (ppm, %) worden vermeld

1.3.5. Spectraalgegevens (UV, IR, NMR of massaspectrum)

1.3.6.1. Gel permeatie chromatographie (GPC)

1.4. Detectie- en bepalingmethoden

Volledige beschrijving van de gebruikte methodes of literatuurverwijzing voor deze methodes.

Naast informatie over detectie- en bepalingmethoden moet informatie worden verschaft over de analysemethoden die de kennisgever bekend zijn en waarmee de aanwezigheid van een stof en de omzettingen daarvan na lozing in het milieu kan worden aangetoond en rechtstreekse blootstelling van mensen kan worden vastgesteld.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.0. Productie

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die voor mens en milieu aan het productieproces kunnen zijn verbonden. Precieze details over het productieproces, met name commercieel gevoelige details, worden niet vereist.

2.0.1. Bij de productie toegepast(e) technologisch(e) procédé(s).

2.0.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van de productie :

— werkomgeving,

— milieu.

2.1. Beoogde gebruiksdoeleinden

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die, gelet op de beoogde/te verwachten gebruiksdoeleinden, voor mens en milieu aan de stoffen kunnen zijn verbonden.

2.1.1. Aard van het gebruik : beschrijving van de functie en de nagestreefde effecten.

2.1.1.1. Technologisch(e) procédé(s) waarbij de stof wordt gebruikt (voor zover bekend).

2.1.1.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van het gebruik (voor zover bekend) :

— werkomgeving,

— milieu.

2.1.1.3. Vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht : stof, preparaat, produkt.

2.1.1.4. Concentratie van de stof in preparaten en produkten die in de handel worden gebracht (voor zover bekend)

2.1.2. Toepassingsgebieden met geraamde onderverdeling :

— industrie

— landbouwers en ambachtslieden

— gebruik door het grote publiek

2.1.3. Voor zover bekend en indien van toepassing, de identiteit van de afnemers van de stof

2.1.4. Hoeveelheden afval en samenstelling van het afval dat uit de beoogde gebruiksdoeleinden voortvloeit (voor zover bekend)

2.2. Geraamde productie en/of invoer voor elk der beoogde gebruiksdoeleinden of -sectoren

2.2.1. Totale productie en/of invoer in ton per jaar :

— in het eerste kalenderjaar

— in de volgende kalenderjaren.

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als de alleenvertegenwoordiger van de fabrikant, moet deze informatie voor elk van de onder rubriek 0 bedoelde importeurs worden verschaft.

2.2.2. Productie en/of invoer, opgesplitst volgens de punten 2.1.1 en 2.1.2 (in %) :

— in het eerste kalenderjaar

1.2.3. Identité et concentration des monomères et des substances de départ qui se trouveront sous forme liée dans le polymère

1.2.4. Indication des groupes terminaux et identité et fréquence des groupes fonctionnels réactifs

1.3. Composition de la substance

1.3.1. Pureté en pourcentage (%)

1.3.2. Nature des impuretés, y compris des sous-produits

1.3.2.1. Identité des monomères sous forme non réagie

1.3.3. Pourcentage des impuretés principales (significatives)

1.3.3.1. Pourcentage des monomères sous forme non réagie

1.3.4. Si la substance contient un stabilisant ou un inhibiteur ou d'autres additifs, en préciser la nature, l'ordre de grandeur : ... ppm, ... %

1.3.5. Données spectrales (UV, IR, RMN ou spectre de masse)

1.3.6.1. Chromatographie de perméation de gel (GPC)

1.4. Méthodes de détection et de détermination

Description complète des méthodes utilisées ou indication des références bibliographiques.

Outre l'indication des méthodes de détection et de détermination, le notifiant doit présenter les méthodes d'analyse dont il a connaissance et qui permettent de suivre la substance et ses produits de transformation après leur introduction dans l'environnement ou de déterminer l'exposition humaine directe.

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.0. Production

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer de manière approximative mais réaliste les risques que le processus de production peut présenter pour l'homme et l'environnement. Les détails précis concernant le processus de fabrication, et notamment ceux qui sont particulièrement sensibles du point de vue commercial, ne sont pas exigés.

2.0.1. Procédés technologiques utilisés pour la production

2.0.2. Estimation de l'exposition relative à la production :

— milieu de travail,

— environnement.

2.1. Utilisations envisagées

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer de manière approximative mais réaliste les risques que les substances, compte tenu des utilisations envisagées/prévisibles, peuvent présenter pour l'homme et l'environnement.

2.1.1. Types d'utilisation : description de la fonction et des effets recherchés.

2.1.1.1. Procédé(s) technologique(s) relatif(s) à l'utilisation de la substance [lorsqu'il(s) est (sont) connu(s)]

2.1.1.2. Prévision(s) de l'exposition relative(s) à l'utilisation [lorsqu'elle(s) est (sont) connue(s)] :

— milieu de travail,

— environnement.

2.1.1.3. Forme sous laquelle la substance est mise sur le marché : substance, préparation, produit

2.1.1.4. Concentration de la substance dans les préparations ou les produits mis sur le marché (lorsqu'elle est connue)

2.1.2. Domaines d'application avec ventilation approximative :

— industries

— professionnels de l'agriculture et de l'artisanat

— utilisation par le grand public

2.1.3. Si approprié, identité des clients (lorsqu'elle est connue)

2.1.4. Quantité et composition des déchets résultant de l'utilisation envisagée (lorsqu'elles sont connues)

2.2. Production et/ou importation prévue pour chacune des utilisations ou chacun des domaines d'utilisation envisagés

2.2.1. Production et/ou importations globales, exprimées en tonnes par an :

— la première année civile

— les années civiles suivantes

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, cette information doit être donnée par chacun des importateurs identifiés au point 0.

2.2.2. Production et/ou importation ventilée suivant les points 2.1.1 et 2.1.2 et exprimée en pourcentage :

— la première année civile

— in de volgende kalenderjaren

2.3. Aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen

2.3.1. Bij behandeling

2.3.2. Bij opslag

2.3.3. Bij vervoer

2.3.4. Bij brand (aard van de verbrandings- of pyrolysegassen, indien dit, gezien het beoogde gebruik, noodzakelijk is)

2.3.5. Andere gevaren, met name chemische reactie met water

2.3.6. Indien van toepassing, informatie over mogelijk ontploffingsgevaar van de stof wanneer deze zich in stofvormige toestand voordoet.

2.4. Noodmaatregelen in geval van incidenteel vrijkomen

2.5. Noodmaatregelen in geval van ongevallen met personen (bij voorbeeld vergiftiging)

2.6. Verpakking

3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF

3.0. Toestand van de stof bij 20° C en 101,3 kPa

3.1. Smelttraject (bij voorbeeld uit het onderzoek naar thermische stabiliteit)

3.3. Relatieve dichtheid

3.6.1. Extraheerbaarheid met water

3.10. Ontvlambaarheid

3.11. Ontploffingsgevaar

3.12. Zelfontbrandingstemperatuur

3.15. Deeltjesgrootte

Stoffen die in de handel kunnen worden gebracht in een vorm waardoor gevaar van blootstelling via inhalatie bestaat, moeten worden getest om de verdeling van de deeltjesgrootte vast te stellen in de stof zoals die in de handel zal worden gebracht.

3.16. Thermische stabiliteit

3.17. Extraheerbaarheid met :

— water bij pH 2 en 9 en 37° C

— cyclohexaan

4. TOXICOLOGISCH ONDERZOEK

Afhankelijk van de aanwezigheid van reactieve groepen, structurele/fysische kenmerken of kennis omtrent de eigenschappen van laag moleculaire bestanddelen van het polymeer of de mogelijke blootstelling kan de bevoegde instantie per geval bepaald onderzoek vereisen. In het bijzonder, zonder dat dit vertraging oplevert voor de aanvaarding van de kennisgeving, kan onderzoek naar de toxiciteit bij inademing (bij voorbeeld 4.1.2 of 4.2.1.) worden vereist, indien deze wijze van blootstelling niet is uitgesloten.

5. ECOTOXICOLOGISCH ONDERZOEK

Afhankelijk van de aanwezigheid van reactieve groepen, structurele/fysische kenmerken of kennis omtrent de eigenschappen van laag moleculaire bestanddelen van het polymeer of de mogelijke blootstelling kan de bevoegde instantie per geval bepaald onderzoek vereisen, zonder dat dit vertraging oplevert voor de aanvaarding van de kennisgeving.

In het bijzonder kunnen de volgende onderzoeken worden vereist :

— de stabiliteit onder invloed van licht, indien het polymeer niet specifiek voor licht gestabiliseerd is;

— de extraheerbaarheid op lange termijn (uitloogtest); afhankelijk van de resultaten van deze test kan per geval relevant onderzoek van de uitloogvloeistof worden vereist.

6. MOGELIJKHEID OM DE STOF ONSCHADELIJK TE MAKEN

6.1. Bij industrie of ambacht

6.1.1. Mogelijkheden tot terugwinning

6.1.2. Mogelijkheden tot neutralisatie van negatieve effecten

6.1.3. Mogelijkheden tot vernietiging :

— gecontroleerd lozen

— verbranden

— waterzuiveringsinstallatie

— overige

6.2. Bij het grote publiek

6.2.1. Mogelijkheden tot terugwinning

6.2.2. Mogelijkheden tot neutralisatie van negatieve effecten

6.2.3. Mogelijkheden tot vernietiging :

— gecontroleerd lozen

— verbranden

— waterzuiveringsinstallatie

— overige

— les années civiles suivantes

2.3. Méthodes et précautions recommandées relatives :

2.3.1. à la manipulation

2.3.2. au stockage

2.3.3. au transport

2.3.4. à l'incendie (nature des gaz de combustion ou pyrolyse, lorsque les usages envisagés le justifient)

2.3.5. Autres dangers, notamment réaction chimique avec l'eau

2.3.6. Le cas échéant, informations sur le risque d'explosion de la substance, lorsqu'elle se présente sous forme de poussières

2.4. Mesures d'urgence en cas de dispersion accidentelle

2.5. Mesures d'urgence en cas de dommages corporels (par exemple, empoisonnement)

2.6. Emballage

3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE

3.0. Etat de la substance à 20° C et 101,3 kPa

3.1. Point de fusion (par exemple, résultant de l'essai de stabilité thermique)

3.3. Densité relative

3.6.1. Extractivité par l'eau

3.10. Inflammabilité

3.11. Danger d'explosion

3.12. Température d'auto-inflammation

3.15. Granulométrie

Pour les substances qui peuvent être mises sur le marché sous une forme créant un risque d'exposition par inhalation, il y a lieu de procéder à un essai pour déterminer la granulométrie de la substance telle qu'elle sera mise sur le marché.

3.16. Stabilité thermique

3.17. Extractivité par :

— l'eau aux pH 2 et 9 à 37° C

— le cyclohexane

4. ETUDES TOXICOLOGIQUES

Au cas par cas et sans retarder l'acceptation de la notification, certains essais peuvent être requis par les autorités compétentes en fonction de la présence de groupes réactifs, des caractéristiques structurales/physiques, de la connaissance des propriétés des composants à faible poids moléculaire du polymère ou des possibilités d'exposition. Notamment des essais de toxicité par inhalation (par exemple aux points 4.1.2, 4.2.1.) pourront être demandés s'il y a des possibilités d'exposition par cette voie.

5. ETUDES ECOTOXICOLOGIQUES

Au cas par cas et sans retarder l'acceptation de la notification, certains essais peuvent être requis en fonction de la présence de groupes réactifs, des caractéristiques structurales/physiques, de la connaissance des propriétés des composants à faible poids moléculaire du polymère ou des possibilités d'exposition. Dans ce cas, les essais complémentaires suivants peuvent être demandés :

— la stabilité à la lumière si le polymère n'est pas spécifiquement conçu pour cela

— l'extractivité à long terme (essai de lixiviation)

En fonction des résultats de cet essai, tout essai approprié sur le lixiviat peut être exigé au cas par cas.

6. POSSIBILITE DE RENDRE LA SUBSTANCE INOFFENSIVE

6.1. Niveau industrie/artisanat

6.1.1. Possibilité de recyclage

6.1.2. Possibilité de neutralisation des effets défavorables

6.1.3. Possibilité de destruction :

— décharge contrôlée

— incinération

— station d'épuration des eaux

— autres

6.2. Niveau grand public

6.2.1. Possibilité de recyclage

6.2.2. Possibilité de neutralisation des effets défavorables

6.2.3. Possibilité de destruction :

— décharge contrôlée

— incinération

— station d'épuration des eaux

— autres

C.2.2. Polymeren die in de Gemeenschap in de handel worden gebracht in hoeveelheden van minder dan 1 ton per jaar of minder dan 5 ton in totaal

0. IDENTITEIT VAN DE FABRIKANT EN IDENTITEIT VAN DE KENNISGEVER; LIGGING VAN HET PRODUKTIETERREIN

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als enige vertegenwoordiger van de fabrikant: de identiteit en de adressen van de importeurs die de stof op het grondgebied van de Gemeenschap brengen.

I. IDENTITEIT VAN DE STOF

1.1. Benaming

- 1.1.1. Naam volgens de nomenclatuur van de IUPAC
- 1.1.2. Andere namen (gewone naam, handelsbenaming, afkorting)
- 1.1.3. CAS-nummer en CAS-benaming (indien beschikbaar)

1.2. Molecuulformule en structuurformule

- 1.2.1. Aantalgemiddeld molecuulgewicht
- 1.2.2. Molecuulgewichtsverdeling (MGV)
- 1.2.3. Identiteit en concentratie van de uitgangsmoermoneren en -stoffen die in het polymeer worden gebonden

1.2.4. Vermelding van de eindgroepen en de identiteit en frequentie van reactieve functionele groepen

1.3. Samenstelling van de stof

- 1.3.1. Zuiverheidsgraad (in %)
- 1.3.2. Aard van de onzuiverheden, met inbegrip van bijproducten
- 1.3.2.1. Identiteit van monomeren die niet hebben gereageerd
- 1.3.3. Percentage van de voornaamste (significante) onzuiverheden
- 1.3.3.1. Percentage van de monomeren die niet hebben gereageerd
- 1.3.4. Indien de stof een stabilisator, een inhibitor of andere additieven bevat, moeten hiervan de aard en het gehalte (ppm, %) worden vermeld

1.3.5. Spectraalgegevens (UV, IR, NMR of massaspectrum)

1.3.6.1. Gel permeatie chromatographie (GPC)

1.4. Detectie- en bepalingmethoden

Volledige beschrijving van de gebruikte methodes of literatuurverwijzing voor deze methodes.

Naast informatie over detectie- en bepalingmethoden moet informatie worden verschaft over de analysemethoden die de kennisgever bekend zijn en waarmee de aanwezigheid van een stof en de omzettingen daarvan na lozing in het milieu kan worden aangetoond en rechtstreekse blootstelling van mensen kan worden vastgesteld.

2. GEGEVENS INZAKE DE STOF

2.0. Productie

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die voor mens en milieu aan het productieproces kunnen zijn verbonden. Precieze details over het productieproces, met name commercieel gevoelige details, worden niet vereist.

2.0.1. Bij de productie toegepast(e) technologisch(e) procédé(s).

2.0.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van de productie:
— werkomgeving
— milieu

2.1. Beoogde gebruiksdoeleinden

De in deze rubriek gegeven informatie moet voldoende zijn om een benaderende doch realistische schatting te kunnen maken van de risico's die, gelet op de beoogde/te verwachten gebruiksdoeleinden, voor mens en milieu aan de stoffen kunnen zijn verbonden.

2.1.1. Aard van het gebruik: beschrijving van de functie en de nagestreefde effecten

2.1.1.1. Technologisch(e) procédé(s) waarbij de stof wordt gebruikt (voor zover bekend)

2.1.1.2. Schatting van de blootstelling ten gevolge van het gebruik (voor zover bekend):

- werkomgeving
- milieu

2.1.1.3. Vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht: stof, preparaat, produkt

2.1.1.4. Concentratie van de stof in preparaten en produkten die in de handel worden gebracht (voor zover bekend)

2.1.2. Toepassingsgebieden met geraamde onderverdeling:

- industrie
- landbouwers en ambachtslieden
- gebruik door het grote publiek

C.2.2. Polymères placés sur le marché communautaire dans des quantités inférieures à un tonne par an ou dans des quantités totales inférieures à cinq tonnes

0. IDENTITE DU FABRICANT ET IDENTITE DU NOTIFIANT; LOCALISATION DU LIEU DE PRODUCTION

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le seul représentant du fabricant, l'identité et l'adresse des importateurs qui importeront la substance dans la Communauté.

I. IDENTITE DE LA SUBSTANCE

1.1. Nom

- 1.1.1. Nom suivant la nomenclature de l'UICPA
- 1.1.2. Autres noms (nom commun, non commercial, abréviation)
- 1.1.3. Numéro et dénomination CAS (si disponibles)

1.2. Formule brute et développée

- 1.2.1. Poids moléculaire moyen en nombre
- 1.2.2. Distribution de poids moléculaire (DPM)
- 1.2.3. Identité et concentration des monomères et des substances de départ qui se trouveront sous forme liée dans le polymère

1.2.4. Indication des groupes terminaux et identité et fréquence des groupes fonctionnels réactifs

1.3. Composition de la substance

- 1.3.1. Pureté en pourcentage (%)
- 1.3.2. Nature des impuretés, y compris des sous-produits
- 1.3.2.1. Identité des monomères sous forme non réagie
- 1.3.3. Pourcentage des impuretés principales (significatives)
- 1.3.3.1. Pourcentage des monomères sous forme non réagie
- 1.3.4. Si la substance contient un stabilisant ou un inhibiteur ou d'autres additifs, en préciser la nature, l'ordre de grandeur: ppm, ... %

1.3.5. Données spectrales (UV, IR, RMN ou spectre de masse)

1.3.6.1. Chromatographie de perméation de gel (CPG)

1.4. Méthodes de détection et de détermination

Description complète des méthodes utilisées ou indication des références bibliographiques.

Outre l'indication des méthodes de détection et de dosage, le notifiant doit présenter les méthodes d'analyse dont il a connaissance et qui permettent de suivre la substance et ses produits de transformation après leur introduction dans l'environnement ou de déterminer l'exposition humaine directe.

2. INFORMATIONS RELATIVES A LA SUBSTANCE

2.0. Production

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer de manière approximative mais réaliste les risques que le processus de production peut présenter pour l'homme et l'environnement. Les détails précis concernant le processus de fabrication, et notamment ceux qui sont particulièrement sensibles du point de vue commercial, ne sont pas exigés.

2.0.1. Procédé technologique utilisé pour la production.

2.0.2. Estimation de l'exposition relative à la production:
— milieu de travail
— environnement

2.1. Utilisations envisagées

Les informations fournies dans la présente section devraient être suffisantes pour permettre d'évaluer de manière approximative mais réaliste les risques que les substances, compte tenu des utilisations envisagées/prévisibles, peuvent présenter pour l'homme et l'environnement.

2.1.1. Types d'utilisation: description de la fonction et des effets recherchés

2.1.1.1. Procédé(s) technologique(s) relatif(s) à l'utilisation de la substance [lorsqu'il(s) est (sont) connu(s)]

2.1.1.2. Prévision(s) de l'exposition relative(s) à l'utilisation [lorsqu'elle(s) est (sont) connue(s)]:

- milieu de travail
- environnement

2.1.1.3. Forme sous laquelle la substance est mise sur le marché: substance, préparation, produit

2.1.1.4. Concentration de la substance dans les préparations et les produits mis sur le marché (lorsqu'elle est connue)

2.1.2. Domaines d'application avec ventilation approximative:

- industries
- professionnels de l'agriculture et de l'artisanat
- utilisation par le grand public

2.1.3. Voor zover bekend en indien van toepassing, de identiteit van de afnemers van de stof

2.1.4. Hoeveelheden afval en samenstelling van het afval dat uit de beoogde gebruiksdoeleinden voortvloeit (voor zover bekend)

2.2. Geraamde produktie en/of invoer voor elk der beoogde gebruiksdoeleinden of sectoren

2.2.1. Totale produktie en/of invoer in ton per jaar :

- in het eerste kalenderjaar
- in de volgende kalenderjaren

Voor buiten de Gemeenschap vervaardigde stoffen waarvoor de kennisgever met het oog op de kennisgeving is aangewezen als de alleenverteenwoordiger van de fabrikant, moet deze informatie voor elk van de onder rubriek 0 bedoelde importeurs worden verschaft.

2.2.2. Produktie en/of invoer, opgesplitst volgens de punten 2.1.1 en 2.1.2 (in %) :

- in het eerste kalenderjaar
- in de volgende kalenderjaren

2.3. Aanbevolen methodes en voorzorgsmaatregelen

2.3.1. Bij behandeling

2.3.2. Bij opslag

2.3.3. Bij vervoer

2.3.4. Bij brand (aard van de verbrandings- of pyrolysegassen, indien dit, gezien het beoogde gebruik, noodzakelijk is)

2.3.5. Andere gevaren, met name chemische reactie met water

2.3.6. Indien van toepassing, informatie over mogelijk ontploffingsgevaar van de stof wanneer deze zich in stofvormige toestand voordoet

2.4. Noodmaatregelen in geval van incidenteel vrijkomen

2.5. Noodmaatregelen in geval van ongevallen met personen (bij voorbeeld vergiftiging)

2.6. Verpakking

3. FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN VAN DE STOF

3.0. Toestand van de stof bij 20° C en 101,3 kPa

3.1. Smelttraject (bij voorbeeld uit het onderzoek naar thermische stabiliteit)

3.6.1. Extraheerbaarheid met water

3.10. Ontvlambaarheid »

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister
en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

2.1.3. Si approprié, identité des clients (lorsqu'elle est connue)

2.1.4. Quantité et composition des déchets résultant de l'utilisation envisagée (lorsqu'elles sont connues)

2.2. Production et/ou importation prévue pour chacune des utilisations ou chacun des domaines d'utilisation envisagés

2.2.1. Production et/ou importations globales, exprimées en tonnes par an :

- la première année civile
- les années civiles suivantes

Pour les substances fabriquées en dehors de la Communauté et pour lesquelles, aux fins de la notification, le notifiant a été désigné comme le représentant unique du fabricant, cette information doit être donnée par chacun des importateurs identifiés au point 0.

2.2.2. Production et/ou importation ventilée suivant les points 2.1.1 et 2.1.2. et exprimée en pourcentage :

- la première année civile
- les années civiles suivantes

2.3. Méthodes et précautions recommandées relatives

2.3.1. à la manipulation

2.3.2. au stockage

2.3.3. au transport

2.3.4. à l'incendie (nature des gaz de combustion ou pyrolyse, lorsque les usages envisagés le justifient)

2.3.5. Autres dangers, notamment réaction chimique avec l'eau

2.3.6. Le cas échéant, informations sur le risque d'explosion de la substance, lorsqu'elle se présente sous forme de poussières

2.4. Mesures d'urgence en cas de dispersion accidentelle

2.5. Mesures d'urgence en cas de dommages corporels (par exemple, empoisonnement)

2.6. Emballage

3. PROPRIETES PHYSICO-CHEMIQUES DE LA SUBSTANCE

3.0. Etat de la substance à 20° C et 101,3 kPa

3.1. Point de fusion (par exemple, résultant de l'essai de stabilité thermique)

3.6.1. Extractivité par l'eau

3.10. Inflammabilité »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,

J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,

K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

BILLAGI VIII

OVEREENKOMSTIG ARTIKEL 2, § 1, 2° VEREISTE AANVULLENDE
GEGEVENS EN ONDERZOEKEN

Indien het technisch gezien niet mogelijk is of wetenschappelijk gezien niet noodzakelijk lijkt deze gegevens te verstrekken, moeten de redenen daarvoor duidelijk worden vermeld en aan de bevoegde instanties ter goedkeuring worden voorgelegd.

De naam van de voor het uitvoeren van de onderzoeken verantwoordelijke instelling(en) dient te worden vermeld.

NIVEAU 1

Fysisch-chemisch onderzoek

Verdere onderzoeken naar de fysisch-chemische eigenschappen afhankelijk van de resultaten van de onderzoeken bedoeld in bijlage VII. Dergelijke verdere onderzoeken zouden bij voorbeeld de ontwikkeling kunnen inhouden van analysemethoden waarmee een stof of de omzettingen daarvan kunnen worden geobserveerd en opgespoord, alsmede onderzoeken naar producten die ontstaan bij thermisch uiteenvallen.

Toxicologisch onderzoek

Vruchtbaarheidsonderzoek (één soort, één generatie, mannelijk en vrouwelijk geslacht, meest geschikte toedieningsweg).

Indien de resultaten bij de eerste generatie twijfelachtig zijn, is onderzoek bij een tweede generatie noodzakelijk.

Afhankelijk van het doseringsschema is het mogelijk dat bij dit onderzoek een aanwijzing wordt verkregen omtrent de teratogeniteit. Een positieve aanwijzing moet in een formeel teratologisch onderzoek nader worden bestudeerd :

— Teratologisch onderzoek (één soort, meest geschikte toedieningsweg)

Dit onderzoek moet worden verricht indien de teratogeniteit niet bij het vruchtbaarheidsonderzoek is onderzocht.

— Onderzoek naar de subchronische en/of chronische toxiciteit, met inbegrip van speciale onderzoeken (één soort, mannelijk en vrouwelijk geslacht, meest geschikte toedieningsweg), is vereist indien de resultaten van het in bijlage VII bedoelde onderzoek bij herhaalde toediening of andere relevante gegevens uitwijzen dat nader onderzoek noodzakelijk is.

Effecten die wijzen op de noodzaak van een dergelijk onderzoek zijn onder andere :

- a) ernstige of onomkeerbare schade;
- b) een zeer laag nul-effectniveau of het ontbreken van een nul-effectniveau;
- c) een duidelijke relatie in chemische structuur tussen de onderzochte stof en andere bestaande stoffen waarvan de gevaren bewezen zijn.

— Aanvullend mutageniteitsonderzoek en/of screeningtests met betrekking tot carcinogenese, zoals bepaald in de in bijlage V beschreven onderzoekstrategie.

Wanneer de resultaten van beide onderzoeken van het basisdossier negatief zijn, moeten in overeenstemming met de specifieke eigenschappen en de beoogde doeleinden van de stof verdere onderzoeken worden uitgevoerd.

Wanneer de resultaten van één van beide of beide onderzoeken uit het basisdossier positief zijn, moeten bij aanvullend onderzoek andere *in vivo* proefmethoden worden gebruikt bij dezelfde of andere beëindigingscriteria.

— Toxicokinetische basisinformatie.

Ecotoxicologisch onderzoek

— Verlengd toxiciteitsonderzoek bij *Daphnia magna* (21 dagen).

— Onderzoek bij hogere planten,

— Onderzoek bij regenwormen.

— Aanvullend toxiciteitsonderzoek bij vissen.

ANNEXE VIII

RENSEIGNEMENTS ET ESSAIS COMPLEMENTAIRES REQUIS
CONFORMEMENT A L'ARTICLE 2, PARAGRAPHE 1, 2°

S'il n'est pas possible techniquement ou s'il ne paraît pas scientifiquement nécessaire de fournir une information, les raisons devront en être clairement indiquées et seront soumises à l'approbation des autorités compétentes.

Le nom du ou des organismes responsables de la réalisation des études sera indiqué.

NIVEAU 1

Etudes physico-chimiques

Etudes complémentaires sur les propriétés physico-chimiques en fonction des résultats des études prévues à l'annexe VII. De telles études pourraient inclure, par exemple, le développement de méthodes d'analyse qui permettent de suivre et de détecter une substance ou ses produits de transformation et des études sur les produits de dégradation formés sous traitement thermique.

Etudes toxicologiques

Etude de fertilité (une espèce, une génération, mâles et femelles, voie d'administration la plus appropriée).

En cas de résultats douteux pour la première génération, l'étude d'une deuxième génération est nécessaire.

Grâce à la planification des dosages, il est possible, au cours de cette étude, d'obtenir des indications sur la tératogenèse. Une indication positive devrait être examinée au cours d'une étude formelle de tératogenèse.

— Etude de tératogenèse (une espèce, voie d'administration la plus appropriée).

Cette étude est nécessaire si la tératogenèse n'a pas été examinée ou évaluée dans l'étude de fertilité.

— Une étude de toxicité subchronique et/ou chronique, y compris des études spéciales (une espèce, mâles et femelles, voie d'administration la plus appropriée), est requise si les résultats de l'étude par doses répétées prévues à l'annexe VII ou des informations recueillies par ailleurs montrent la nécessité d'un examen approprié.

Les effets qui indiqueraient la nécessité d'une telle étude pourraient inclure, par exemple :

- a) des lésions graves ou irréversibles;
- b) un niveau « sans effet » très bas ou l'absence de niveau « sans effet »;
- c) une relation claire dans la structure chimique entre la substance considérée et d'autres substances existantes dont les dangers sont prouvés.

— Essais additionnels de mutagenèse et/ou étude(s) de dépistage de cancérogenèse tels que prescrits dans la stratégie pour les essais décrite à l'annexe V.

Lorsque les deux essais du dossier de base sont négatifs, des essais supplémentaires sont réalisés conformément aux propriétés spécifiques et à l'utilisation envisagée de la substance.

Lorsqu'un essai ou les deux essais du dossier de base sont positifs, une étude supplémentaire doit inclure la même finalité ou des finalités différentes dans d'autres méthodes d'essai *in vivo*.

— Informations toxicocinétiques de base.

Etudes écotoxicologiques

— Etude de toxicité prolongée sur *Daphnia magna* (21 jours).

— Essai sur plantes supérieures.

— Essai sur vers de terre.

— Etude de toxicité complémentaire sur les poissons.

— Onderzoek naar soortaccumulatie; één soort, bij voorkeur een vissoort.

— Aanvullend onderzoek naar de afbreekbaarheid, indien uit de in bijlage VII beschreven onderzoeken niet is gebleken dat de stof in voldoende mate afbreekbaar is.

— Nader onderzoek van de adsorptie/desorptie, afhankelijk van de resultaten van de in bijlage VII beschreven onderzoeken.

NIVEAU 2

Toxicologisch onderzoek

De volgende aspecten moeten in het onderzoekprogramma worden betrokken, tenzij er sterke, met bewijsmateriaal gestaafde aanwijzingen zijn om dit niet te doen :

— onderzoek naar de chronische toxiciteit,

— carcinogeniteitsonderzoek,

— vruchtbaarheidsonderzoek (bij voorbeeld over drie generaties) : alleen indien een effect op de vruchtbaarheid is vastgesteld op niveau 1,

— toxiciteitsonderzoek naar peri- en postnatale effecten op de ontwikkeling,

— teratologisch onderzoek (bij andere soorten dan die bij het overeenkomstige onderzoek op niveau 1 zijn gebruikt),

— aanvullend toxicokinetisch onderzoek, waaronder studie van de biotransformatie en farmacokinetiek,

— aanvullend onderzoek voor het opsporen van de toxiciteit in organen of systemen.

Ecotoxicologisch onderzoek

— Aanvullend onderzoek naar accumulatie, degradatie, mobiliteit en adsorptie/desorptie.

— Aanvullend toxiciteitsonderzoek bij vissen.

— Toxiciteitsonderzoek bij vogels.

— Aanvullend toxiciteitsonderzoek bij andere organismen.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister
en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

— Essai pour accumulation dans une espèce; une espèce, de préférence le poisson.

— Etude(s) supplémentaire(s) de dégradation, si une dégradation suffisante n'a pas été prouvée dans le cadre des essais prévus à l'annexe VII.

— Etude(s) complémentaire(s) d'adsorption/désorption dépendant des résultats des investigations prévues à l'annexe VII.

NIVEAU 2

Etudes toxicologiques

Sauf s'il existe des raisons valables de ne pas y recourir et que justification en est fournie, le programme d'essais doit porter sur les aspects suivants :

— étude de toxicité chronique,

— étude de cancérogenèse,

— étude de fertilité (par exemple étude sur trois générations); seulement si un effet sur la fertilité a été constaté au niveau 1,

— étude de toxicité liée au développement concernant les effets péri- et postnataux,

— étude de tératogenèse (espèce non utilisée dans le test correspondant de niveau 1),

— études supplémentaires de toxicocinétique comprenant la biotransformation et la pharmacocinétique,

— essais supplémentaires pour l'investigation de la toxicité dans les organes ou les systèmes.

Etudes écotoxicologiques

— Essais supplémentaires d'accumulation, de dégradation, de mobilité et d'adsorption/désorption.

— Etudes complémentaires de toxicité sur les poissons.

— Etudes de toxicité sur les oiseaux.

— Etudes supplémentaires de toxicité sur d'autres organismes.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,

J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

BIJLAGE IX

DEEL A

Bepalingen betreffende kinderveilige sluitingen

1. Hersluitbare verpakkingen

Kinderveilige sluitingen van hersluitbare verpakkingen moeten voldoen aan ISO-norm 8317 (uitgave 1 juli 1989) betreffende « Kinderveilige verpakkingen — Eisen en beproevingsmethoden ten aanzien van hersluitbare verpakkingen », vastgesteld door de Internationale Organisatie voor normalisatie (ISO).

2. Niet-hersluitbare verpakkingen (p.m.)

3. Opmerkingen

a) Alleen laboratoria die aan de Europese normen EN 45 000-serie voldoen, zijn bevoegd na te gaan of aan bovenstaande norm is voldaan.

b) Bijzonder geval

Indien het duidelijk is dat een verpakking in voldoende mate veilig is voor kinderen omdat kinderen niet bij de inhoud ervan kunnen komen zonder de hulp van een stuk gereedschap, hoeft de test niet te worden uitgevoerd.

In alle andere gevallen en wanneer er voldoende redenen zijn om aan de doeltreffendheid van de kinderveilige sluiting te twijfelen, kan de nationale autoriteit van degene die verantwoordelijk is voor het in de handel brengen, een certificaat eisen dat is afgegeven door een laboratorium als bedoeld onder a), waarin wordt verklaard dat :

— het toegepaste type sluiting zodanig is dat het niet noodzakelijk is om onderzoek volgens bovengenoemde ISO-norm te verrichten,

of

— de sluiting volgens bovengenoemde ISO-norm is onderzocht en aan de voorschriften voldoet.

DEEL B

Bepalingen betreffende bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen

De technische specificaties voor bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen moeten voldoen aan de norm EN 272 (uitgave 20 augustus 1989) betreffende bij aanraking waarneembare gevaarsaanduidingen. ».

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister
en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

ANNEXE IX

PARTIE A

Dispositions relatives aux fermetures de sécurité pour les enfants

1. Emballages refermables

Les fermetures de sécurité pour les enfants, utilisées sur des emballages refermables, doivent correspondre à la norme ISO 8317 (édition du 1^{er} juillet 1989) relative aux « Emballages à l'épreuve des enfants — Exigences et méthodes d'essais pour emballages refermables », adoptée par l'*International Standard Organisation* (ISO).

2. Emballages non refermables (p.m.)

3. Remarques

a) Seuls les laboratoires ayant prouvé qu'ils satisfont aux normes européennes EN série 45000 sont autorisés à certifier la conformité à la norme indiquée ci-dessus.

b) Cas particuliers

S'il semble évident qu'un emballage est suffisamment sûr pour les enfants parce que ceux-ci ne peuvent avoir accès à son contenu sans l'aide d'un outil, l'essai peut ne pas être effectué.

Dans tous les autres cas et lorsqu'elle a des raisons valablement justifiées de douter de l'efficacité de la fermeture de sécurité pour les enfants utilisée, l'autorité nationale peut demander au responsable de la mise sur le marché de lui fournir une attestation délivrée par un laboratoire d'essai du type défini au point a) ci-dessus certifiant :

— que le type de fermeture utilisé est tel qu'il ne nécessite pas d'essais selon la norme ISO mentionnée ci-dessus

ou

— que la fermeture visée, soumise aux essais prévus par la norme ISO mentionnée ci-dessus, est conforme aux prescriptions imposées.

PARTIE B

Dispositions relatives aux dispositifs permettant de détecter les dangers au toucher

Les prescriptions techniques concernant les dispositifs permettant de détecter les dangers au toucher doivent être conformes à la norme EN 272 (édition au 20 août 1989) relative aux indications tactiles de danger. »

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,

J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

Bijlage X

Richtsnoeren voor de samenstelling
van de veiligheidsinformatiebladen

Voor de samenstelling van de veiligheidsinformatiebladen nopens de gevaarlijke stoffen gelden de richtsnoeren die zijn opgenomen in de bijlage V van het koninklijk besluit van 11 januari 1993 tot regeling van de indeling, de verpakking en het kenmerken van gevaarlijke preparaten met het oog op het op de markt brengen of het gebruik ervan, gewijzigd door het koninklijk besluit van 23 juni 1995.

Met dien verstande dat :

- de naam gebruikt voor de identificatie van de stof, voorgeschreven in rubriek 1.1. van de richtsnoeren, gelijk moet zijn aan de naam op het etiket en in overeenstemming met bijlage VI bij dit besluit;
- de informatie op het etiket die volgens rubriek 15 van de richtsnoeren in de veiligheidsinformatiebladen moet herhaald worden deze is die overeenkomstig dit besluit op het etiket moet vermeld worden.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

—————
BIIJLAGE ERB I

RISICOBEOORDELING : GEZONDHEID (TOXICITEIT)

DEEL A

Bij de overeenkomstig art. 3, § 2, 2° uitgevoerde risicobeoordeling dient rekening te worden gehouden met de volgende potentiële toxische effecten en de volgende populaties die kunnen worden blootgesteld :

EFFECTEN

- 1) Acute toxiciteit
- 2) Irriterende de effecten,
- 3) Bijtende effecten
- 4) Overgevoelighedsreacties
- 5) Toxiciteit na herhaalde blootstelling
- 6) Mutageniciteit
- 7) Carcinogeniciteit
- 8) Toxiciteit voor de voortplanting

MENSELIJKE POPULATIES

- 1) Werknemers
- 2) Consumenten
- 3) Indirect via het milieu blootgestelde bevolking

Annexe X

Guide pour l'élaboration
des fiches de données de sécurité

En matière de rédaction des fiches de données de sécurité relatives aux substances dangereuses, le guide, repris en annexe V de l'arrêté royal du 11 janvier 1993 réglementant la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses en vue de leur mise sur le marché ou de leur emploi, modifié par l'arrêté royal du 23 juin 1995, est d'application.

Il est toutefois entendu que :

- la dénomination utilisée pour l'identification de la substance, prévue à la rubrique 1.1. du guide, doit être identique à celle, figurant sur l'étiquette, telle que précisée à l'annexe VI du présent arrêté;
- l'information, figurant sur l'étiquette, devant être reprise dans la fiche de données de sécurité en vertu de la rubrique 15 du guide, est celle qui doit figurer sur l'étiquette conformément au présent arrêté.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

—————
ANNEXE ERB I

EVALUATION DES RISQUES : SANTE HUMAINE (TOXICITE)

PARTIE A

L'évaluation des risques effectuée en application de l'article 3, § 2, 2° tient compte des effets toxiques potentiels suivants et des populations susceptibles d'être exposées suivantes :

EFFETS

- 1) Toxicité aiguë
- 2) Irritation
- 3) Effets corrosifs
- 4) Sensibilisation
- 5) Toxicité par doses répétées
- 6) Mutagénèse
- 7) Cancérogénèse
- 8) Toxicité pour la reproduction

POPULATIONS HUMAINES

- 1) Travailleurs
- 2) Consommateurs
- 3) Homme exposé indirectement via l'environnement

DEEL B

1. OMSCHRIJVING VAN DE GEVAREN

1.1. In gevallen als bedoeld in artikel 3, § 2, 2°, 2a, waarin de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap is uitgevoerd maar de resultaten daarvan niet hebben geleid tot een indeling van de stof, is er met betrekking tot het bedoelde effect geen karakterisering van het risico nodig tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid bestaan, bij voorbeeld positieve resultaten van in vitro mutageniciteitstests.

1.2. In gevallen als bedoeld in artikel 3, § 2, 2°, 2b, waarin de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap nog niet is uitgevoerd, is er met betrekking tot het bedoelde effect geen karakterisering van het risico nodig tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid bestaan, bij voorbeeld een hoge kans op blootstelling of aanwijzingen voor potentiële toxiciteit afgeleid uit het verband tussen structuur en activiteit.

2. EVALUATIE VAN DE DOSIS-RESPONS- (OF CONCENTRATIE-EFFECT-) RELATIE

2.1. Voor wat betreft toxiciteit na herhaalde blootstelling en toxiciteit voor de voortplanting dient de dosis-respons-relatie te worden bepaald en dient, zo mogelijk, het niveau waarbij geen schadelijk effect meer wordt waargenomen (no-observed-adverse-effect level, NOAEL) te worden vastgesteld. Indien geen NOAEL kan worden vastgesteld, moet de laagste dosis of concentratie waarbij een schadelijk effect is waargenomen, d.w.z. het lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL) worden vastgesteld.

2.2. Voor wat betreft acute toxiciteit, bijtende effecten en irriterende effecten is het meestal niet mogelijk om op basis van de resultaten van overeenkomstig de voorschriften van dit besluit uitgevoerde tests een NOAEL of LOAEL vast te stellen. Voor wat betreft acute toxiciteit dient de LD50- of LC50-waarde of, ingeval de "vaste dosismethode" is gebruikt, de differentiërende dosis te worden bepaald. Voor wat betreft de andere effecten volstaat het te bepalen of de stof over intrinsieke eigenschappen beschikt om dergelijke effecten te kunnen veroorzaken.

2.3. Voor wat betreft mutageniciteit en carcinogeniciteit volstaat het te bepalen of de stof over intrinsieke eigenschappen beschikt om dergelijke effecten te kunnen veroorzaken. Indien evenwel kan worden aangetoond dat een als carcinogeen geïdentificeerde stof niet-genotoxisch is, dient een NOAEL of LOAEL te worden bepaald als beschreven in punt 2.1.

2.4. Aangezien er met betrekking tot overgevoeligheidsreacties van de huid en de ademhalingswegen geen eensgezindheid bestaat over de vraag of een dosis/concentratie kan worden vastgesteld waarbeneden meestal geen schadelijke effecten optreden bij reeds voor deze stof gesensibiliseerde personen, volstaat het te beoordelen of de stof in kwestie over intrinsieke eigenschappen beschikt om dergelijke effecten te kunnen veroorzaken.

3. EVALUATIE VAN DE BLOOTSTELLING

3.1. Er dient een evaluatie te worden uitgevoerd van de blootstelling van elk van de menselijke populaties (werknemers, consumenten, bevolking die indirect via het milieu kan worden blootgesteld) die redelijkerwijs geacht kan worden met de stof in aanraking te zullen komen. Het doel van deze evaluatie is het maken van een kwantitatieve of kwalitatieve schatting van de dosis/concentratie van deze stof waaraan een populatie is of kan worden blootgesteld. Bij deze schatting wordt rekening gehouden met eventuele variaties van het blootstellingspatroon in ruimte en tijd.

3.2. De evaluatie van de blootstelling dient gebaseerd te worden op de overeenkomstig deel 2 van de bijlagen VII A, VII B of VII C van dit besluit in het technisch dossier verstrekte gegevens alsmede op alle andere beschikbare en relevante gegevens. Met name dient in voorkomend geval rekening te worden gehouden met :

- i) adequate meetgegevens met betrekking tot de blootstelling;
- ii) de op de markt gebrachte hoeveelheden van de stof in kwestie;
- iii) de vorm waarin de stof op de markt wordt gebracht en/of gebruikt (b.v. in zuivere vorm of als bestanddeel van een preparaat);

PARTIE B

1. IDENTIFICATION DU DANGER

1.1. Lorsque l'essai destiné à identifier un danger lié à un effet potentiel particulier a été effectué, et que les résultats n'ont pas conduit à une classification (article 3, § 2, 2°, 2a), la caractérisation du risque associé à cet effet n'est pas nécessaire, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés, par exemple si l'on dispose de résultats d'essai in vitro positifs pour la mutagenicité.

1.2. Lorsqu'un essai destiné à identifier un danger lié à un effet potentiel particulier n'a pas encore été effectué (article 3, § 2, 2°, 2b), la caractérisation du risque associé à cet effet n'est pas nécessaire, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés, compte tenu par exemple de l'exposition ou du fait que les relations activité/structure indiquent une toxicité potentielle.

2. EVALUATION DU RAPPORT DOSE (CONCENTRATION) — REPONSE (EFFET)

2.1. En ce qui concerne la toxicité par doses répétées et la toxicité pour la reproduction, la relation dose-réponse est évaluée et la dose sans effet nocif observé (NOAEL) est, si possible, identifiée. S'il n'est pas possible d'identifier une NOAEL, la concentration/dose la plus faible pour laquelle est observé un effet indésirable (LOAEL) est identifiée.

2.2. Pour la toxicité aiguë, les effets corrosifs et l'irritation, il n'est généralement pas possible d'obtenir une NOAEL ou une LOAEL sur la base des résultats des essais effectués conformément aux exigences du présent arrêté. Pour la toxicité aiguë, on calcule la valeur de la DL50 ou de la CL50 ou, lorsque la méthode de la dose fixée a été utilisée, on calcule la dose discriminante. Pour les autres effets, il suffit de déterminer si la substance est intrinsèquement capable de provoquer de tels effets.

2.3. Pour la mutagenicité et la carcinogénicité, il suffit de déterminer si la substance est intrinsèquement capable de provoquer de tels effets. Toutefois, s'il peut être démontré qu'une substance identifiée comme cancérigène n'est pas génotoxique, il convient d'identifier une NOAEL/LOAEL comme prévu au point 2.1.

2.4. En ce qui concerne la sensibilisation de la peau et la sensibilisation respiratoire, dans la mesure où il n'y a pas de consensus sur la possibilité de déterminer une concentration/dose en-dessous de laquelle des effets indésirables ne sont pas susceptibles de se produire chez un sujet déjà sensibilisé à une substance donnée, il suffit de déterminer si la substance est intrinsèquement capable de provoquer de tels effets.

3. EVALUATION DE L'EXPOSITION

3.1. Une évaluation de l'exposition est effectuée pour chaque catégorie de population humaine (travailleurs, consommateurs et homme susceptible d'être exposé via l'environnement) dont on peut raisonnablement prévoir qu'elle sera exposée à la substance. L'objectif de l'évaluation consiste à estimer sur les plans quantitatif ou qualitatif la concentration/dose de la substance à laquelle une population est ou peut être exposée. Cette estimation tient compte des variations locales dans le temps et dans le mode d'exposition.

3.2. L'évaluation de l'exposition repose sur les informations contenues dans le dossier technique fourni conformément à la section 2 de l'annexe VII A, de l'annexe VII B ou de l'annexe VII C du présent arrêté et sur toute autre information disponible ou pertinente. Une attention particulière est accordée, le cas échéant :

- i) à des données d'exposition convenablement mesurées;
- ii) à la quantité de substance sur le marché;
- iii) à la forme sous laquelle la substance est mise sur le marché et/ou utilisée (par exemple substance en tant que telle ou incorporée dans une préparation);

iv) toepassingscategorieën en mate van inperking;

v) eventueel relevante procesgegevens;

vi) fysisch-chemische eigenschappen van de stof, met inbegrip van eventueel relevante, door het proces daaraan ontleende eigenschappen (b.v. aerosolvorming);

vii) waarschijnlijke wegen van blootstelling en beschikbaarheid voor opname;

viii) frequentie en duur van blootstelling.

ix) aard en omvang van de specifiek blootgestelde bevolkingsgroep(en) indien deze gegevens beschikbaar zijn.

3.3. Indien bij de schatting van blootstellingsniveaus gebruik wordt gemaakt van voorspellingstechnieken, dient de voorkeur gegeven te worden aan monitoring van stoffen met vergelijkbare toepassing en blootstellingspatronen.

3.4. Indien een stof in een preparaat is verwerkt, is een onderzoek naar de blootstelling aan de stof in dat preparaat alleen noodzakelijk als het laatstgenoemde op basis van de toxicologische eigenschappen van de stof is ingedeeld overeenkomstig het K.B. van 11 januari 1993 tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid zijn.

4. KARAKTERISERING VAN HET RISICO

4.1. Als voor een van de effecten beschreven in bijlage ERB IA een NOAEL of LOAEL is vastgesteld, omvat de karakterisering van het risico in samenhang met de betreffende effecten een vergelijking van het NOAEL of LOAEL met de schatting van de dosis of concentratie waaraan de populatie(s) zal/zullen worden blootgesteld. Indien een kwantitatieve schatting van de blootstelling beschikbaar is, dient de verhouding tussen blootstellingsniveau en NOAEL of LOAEL te worden berekend. Uitgaande van de vergelijking tussen de kwantitatieve of kwalitatieve schatting van de blootstelling en het NOAEL of LOAEL beslist de Minister welke van de vier in artikel 3, § 2, 1°, 4 genoemde conclusies van toepassing is.

4.2. Als voor een van de effecten beschreven in bijlage ERB IA geen NOAEL of LOAEL is vastgesteld, omvat de karakterisering van het risico in samenhang met de betreffende effecten een beoordeling van de kans dat het effect zich zal voordoen, op basis van de voor de betrokken menselijke populaties relevante kwantitatieve of kwalitatieve blootstellingsgegevens (1). Na deze beoordeling beslist de Minister welke van de vier in artikel 3, § 2, 1°, 4 genoemde conclusies van toepassing is.

4.3. Bij de beslissing welke van de vier in artikel 3, § 2, 1°, 4, genoemde conclusies van toepassing is, houdt de Minister onder meer rekening met :

i) de onzekerheid die onder meer het gevolg is van de spreiding van de proefresultaten alsmede van intra- en interspecifieke verschillen;

ii) de aard en ernst van het effect;

iii) de menselijke populatie waarop de kwantitatieve en/of kwalitatieve blootstellingsgegevens betrekking hebben.

5. SYNTHESE

5.1. Overeenkomstig het bepaalde in artikel 3, § 2, 2°, 1 kan een karakterisering van het risico worden uitgevoerd met betrekking tot meer dan één potentieel schadelijk effect of meer dan één menselijke populatie. In dergelijke gevallen bepaalt de Minister voor elk effect afzonderlijk welke van de vier in artikel 3, § 2, 1°, 4 genoemde

iv) aux catégories d'utilisation et au degré de confinement;

v) aux données relatives aux procédés, si approprié;

vi) aux propriétés physico-chimiques de la substance, y compris, s'il y a lieu, celles qu'elle acquiert au cours de son traitement (par exemple formation d'aérosols);

vii) aux modes d'exposition probables et au potentiel d'absorption;

viii) à la fréquence et à la durée de l'exposition.

ix) au type et à la taille des populations particulières exposées, si l'information est disponible.

3.3. Lorsque des méthodes prédictives sont utilisées pour l'estimation des niveaux d'exposition, la préférence est accordée aux données de surveillance relatives aux substances ayant des modes d'utilisation et d'exposition analogues.

3.4. Si une substance est incorporée dans une préparation, il ne faut tenir compte de l'exposition à ladite substance que si la préparation est classée sur la base des propriétés toxicologiques de la substance conformément à l'A.R. du 11 janvier 1993, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés.

4. CARACTERISATION DES RISQUES

4.1. Lorsque, pour un des effets de l'annexe ERB IA, une NOAEL ou une LOAEL a été identifiée pour un effet, la caractérisation du risque associé à cet effet implique une comparaison entre la NOAEL ou la LOAEL et l'estimation de la dose/concentration à laquelle la(les) population(s) sera (seront) exposée(s). Si une estimation quantitative de l'exposition est disponible, une relation niveau d'exposition/N(L)OAEL est calculée. Sur la base de cette comparaison entre l'estimation quantitative ou qualitative de l'exposition et la N(L)OAEL, le Ministre détermine quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4, celle qui s'impose.

4.2. Lorsque, pour un des effets de l'annexe ERB IA, une N(L)OAEL n'a pas été déterminée, la caractérisation du risque associé à l'effet considéré implique une évaluation de la probabilité de l'apparition de cet effet, sur la base des informations quantitatives et/ou qualitatives concernant l'exposition qui se rapportent aux populations humaines considérées (1). Après avoir effectué l'évaluation, le Ministre détermine quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4, celle qui s'impose.

4.3. Au moment de déterminer quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4, celle qui s'impose, le Ministre tient compte, entre autres, de :

i) l'incertitude due notamment à la variabilité des données expérimentales et à la variation intra- et inter-espèces;

ii) la nature et la gravité de l'effet;

iii) la population humaine à laquelle se rapportent les informations quantitatives et/ou qualitatives concernant l'exposition.

5. INTEGRATION

5.1. Conformément aux dispositions de l'article 3, § 2, 2°, 1, une caractérisation des risques peut être effectuée pour plusieurs effets indésirables potentiels ou plusieurs populations humaines. En de tels cas, le Ministre détermine quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4, celle qui s'impose pour chaque effet.

(1) Als, ondanks het feit dat geen NOAEL/LOAEL is bepaald, de resultaten van de test niettemin aantonen dat er een verband bestaat tussen de dosis/concentratie en de ernst van het schadelijk effect, of als het in het kader van een proefmethode waarbij slechts één dosis of concentratie wordt gebruikt, mogelijk is de relatieve ernst van het effect te evalueren, dient ook met deze gegevens rekening te worden gehouden bij het inschatten van de kans dat het effect zich zal voordoen.

(1) Lorsque les résultats de l'essai démontrent, bien qu'une N(L)OAEL n'ait pas été déterminée, qu'il existe une relation entre la dose/concentration et la gravité d'un effet indésirable ou lorsqu'il est possible, dans le cadre d'une méthode d'essai utilisant une seule dose ou concentration, d'évaluer la relative gravité de l'effet, ces informations sont également prises en compte lors de l'évaluation de la probabilité d'apparition de l'effet.

conclusies van toepassing is. Nadat de beoordeling van het risico is voltooid, onderwerpt de Minister de diverse conclusies aan een grondig onderzoek en formuleert hij eindconclusies waarin met alle aspecten van de toxiciteit van de stof rekening wordt gehouden.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E.DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

BIJLAGE ERB II

RISICOBEOORDELING :
GEZONDHEID (FYSISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAPPEN)

DEEL A

Bij de overeenkomstig art. 3, § 2, 2° uitgevoerde risicobeoordeling dient rekening te worden gehouden met de potentiële schadelijke effecten die in de hierna genoemde menselijke populaties kunnen optreden als gevolg van een eventuele blootstelling aan stoffen met de hierna genoemde eigenschappen :

Eigenschappen

1. Ontploffbaarheid
2. Ontvlambaarheid
3. Oxiderend vermogen

Menselijke populaties

1. Werknemers
2. Consumenten
3. Indirect via het milieu blootgestelde bevolking

DEEL B

1. OMSCHRIJVING VAN DE GEVAREN

1.1. In gevallen als bedoeld in artikel 3, § 2, 2°, 2a, waarin de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap is uitgevoerd maar de resultaten daarvan niet hebben geleid tot een indeling van de stof, is er met betrekking tot de bedoelde eigenschap geen karakterisering van het risico nodig tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid bestaan.

1.2. In gevallen als bedoeld in artikel 3, § 2, 2°, 2b, waarin de passende test voor de vaststelling van een bepaald schadelijk effect of een bepaalde schadelijke eigenschap nog niet is uitgevoerd, is er met betrekking tot de bedoelde eigenschap geen karakterisering van het risico nodig tenzij er andere goede redenen tot bezorgdheid bestaan.

Une fois l'évaluation des risques terminée, le Ministre revoit les différentes conclusions et formule des conclusions intégrées concernant la toxicité globale de la substance.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E.DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

ANNEXE ERB II

EVALUATION DES RISQUES : SANTE HUMAINE (PROPRIETES
PHYSICO-CHIMIQUES)

PARTIE A

L'évaluation des risques effectuée en application de l'art. 3, § 2, 2° tient compte des effets indésirables potentiels qui pourraient apparaître dans les catégories de populations humaines suivantes, susceptibles d'être exposées aux substances ayant les propriétés suivantes :

Propriétés

1. Explosibilité
2. Inflammabilité
3. Pouvoir comburant

Populations humaines

1. Travailleurs
2. Consommateurs
3. Homme exposé indirectement via l'environnement

PARTIE B

1. IDENTIFICATION DU DANGER

1.1. Dans les cas où l'essai destiné à identifier un danger lié à une propriété particulière a été effectué, mais où les résultats n'ont pas abouti à une classification (article 3, paragraphe 2, 2°, 2a) la caractérisation du risque associé à cette propriété n'est pas nécessaire, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés.

1.2. Dans les cas où l'essai destiné à identifier un danger lié à une propriété particulière n'a pas encore été effectué (article 3, paragraphe 2, 2°, 2b), la caractérisation du risque associé à cette propriété n'est pas nécessaire, à moins que l'on ait d'autres doutes fondés.

2. EVALUATIE VAN DE BLOOTSTELLING

2.1. Indien een karakterisering van het risico moet worden uitgevoerd waarbij artikel 3, § 2, 2°, 2 van toepassing is, hoeven alleen de redelijkerwijs te voorziene gebruiksomstandigheden te worden bepaald op basis van de overeenkomstig deel 2 van de bijlagen VII A, VII B of VII C van dit besluit in het technisch dossier verstrekte gegevens met betrekking tot de stof.

3. KARAKTERISERING VAN HET RISICO

3.1. De karakterisering van het risico dient een beoordeling te omvatten van de kans dat in de redelijkerwijs te voorziene gebruiksomstandigheden een schadelijk effect wordt veroorzaakt. Indien de beoordeling laat vermoeden dat er geen schadelijk effect zal worden veroorzaakt, is doorgaans de in artikel 3, § 2, 1°, 4a, genoemde conclusie van toepassing. Indien de beoordeling laat vermoeden dat er wel een schadelijk effect zal worden veroorzaakt, is doorgaans de in artikel 3, § 2, 1°, 4d, genoemde conclusie van toepassing.

4. SYNTHESE

4.1. Indien met betrekking tot verschillende effecten of menselijke populaties verschillende aanbevelingen ter beperking van het risico zijn gedaan, worden deze, nadat de risicobeoordeling is voltooid, aan een grondig onderzoek onderworpen en formuleert de Minister aanbevelingen waarin met alle aspecten rekening wordt gehouden.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

BIJLAGE ERB III

RISICOBEOORDELING : MILIEU

1. Omschrijving van de gevaren :

1.1. Voor niet als gevaarlijk voor het milieu ingedeelde stoffen als bedoeld in artikel 3, § 2, 3°, 2a, dient de Minister te bepalen of er andere goede redenen zijn om een karakterisering van het risico uit te voeren, waarbij hij met name rekening houdt met :

- i) aanwijzingen dat de stof bioaccumuleert;
- ii) het bij ecotoxicologische tests waargenomen verloop van de toxiciteit in de tijd;
- iii) op toxicologisch onderzoek gebaseerde aanwijzingen voor andere schadelijke effecten, bij voorbeeld indeling als mutagene, vergiftige of zeer vergiftige stof of als schadelijke stof waaraan de risicozin R40 (« onherstelbare effecten niet uitgesloten ») of R48 (« gevaar voor ernstige schade aan de gezondheid bij langdurige blootstelling ») is toegekend;

2. EVALUATION DE L'EXPOSITION

2.1. Si la caractérisation du risque a été effectuée conformément à l'article 3, § 2, 2°, 2, il faut uniquement déterminer les conditions d'utilisation raisonnablement prévisibles sur la base des informations relatives à la substance contenues dans le dossier technique, comme prévu à la section 2 de l'annexe VII A, de l'annexe VII B ou de l'annexe VII C du présent arrêté.

3. CARACTERISATION DES RISQUES

3.1. La caractérisation du risque implique une évaluation de la probabilité d'un effet indésirable dans les conditions d'utilisation raisonnablement prévisibles. Si cette évaluation indique qu'il n'y aura pas d'effet indésirable, on aboutit normalement à la conclusion de l'article 3, paragraphe 2, 1°, 4a. Si cette évaluation indique que se produira un effet indésirable, la conclusion de l'article 3, § 2, 1°, 4d s'appliquera en général.

4. INTEGRATION

4.1. Lorsque différentes recommandations concernant la réduction des risques ont été formulées pour divers effets ou diverses populations humaines, elles sont revues lorsque l'évaluation des risques est terminée et le Ministre formule des recommandations intégrées.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

ANNEXE ERB III

EVALUATION DES RISQUES : ENVIRONNEMENT

1. Identification du danger :

1.1. Pour les substances non classées dans la catégorie des substances dangereuses pour l'environnement (article 3, § 2, 3°, 2a), le Ministre examine s'il y a lieu, pour d'autres raisons, d'effectuer une caractérisation des risques et tient particulièrement compte :

- i) des éléments indiquant que la substance présente un potentiel de bioaccumulation;
- ii) de la forme de la courbe toxicité/temps obtenue lors des essais d'écotoxicité;
- iii) des conclusions d'études toxicologiques indiquant que la substance a d'autres effets indésirables, par exemple classement de la substance dans la catégorie des substances mutagènes, toxiques ou très toxiques ou nocives avec la phrase de risque R40 (« Possibilité d'effets irréversibles ») ou R48 (« Risque d'effets graves pour la santé en cas d'exposition prolongée »);

iv) gegevens met betrekking tot stoffen met een vergelijkbare structuur.

1.2. Indien de Minister van oordeel is dat er goede redenen zijn om een karakterisering van het risico uit te voeren voor een stof als bedoeld in artikel 3, § 2, 3°, 2b, die niet als schadelijk voor het milieu is ingedeeld en waarvoor er onvoldoende gegevens inzake effecten op organismen voorhanden zijn, neemt hij zo nodig de in artikel 3, § 2, 1°, 4b of c bedoelde maatregelen.

2. EVALUATIE VAN DE DOSIS-RESPONS- (OF CONCENTRATIE-EFFECT-) RELATIE

2.1. Er moet worden getracht te voorspellen beneden welke concentratie van de stof er naar verwachting geen schadelijke effecten in het betrokken milieucompartiment zullen optreden. Deze concentratie wordt « predicted no-effect concentration » (PNEC) genoemd.

2.2. De PNEC wordt vastgesteld op basis van de in het kennisgevingsdossier vermelde gegevens met betrekking tot effecten op organismen, als opgesomd in deel 5 van bijlage VII A of bijlage VII B van dit besluit, alsmede op het in bijlage VIII (niveaus 1 en 2) van dit besluit genoemde ecotoxicologisch onderzoek.

2.3. De PNEC wordt berekend door toepassing van een beoordelingscoëfficiënt op de door middel van tests op proeforganismen verkregen waarden als LD50 (letale-dosismediaan), LC50 (letale-concentratiediaan), EC50 (effectieve-concentratiediaan), IC50 (de concentratie die 50 % inhibitie van een bepaalde parameter, bij voorbeeld groei, veroorzaakt), NOEL/NOEC (no-observed-effect level/concentration) of LOEL/LOEC (lowest-observed-effect level/concentration).

2.4. De beoordelingscoëfficiënt weerspiegelt de mate van onzekerheid die is verbonden aan het extrapoleren van experimentele gegevens betreffende een beperkt aantal soorten naar de veldsituatie toe. Derhalve zijn zowel de onzekerheid als de beoordelingscoëfficiënt in het algemeen kleiner naarmate het gegevensbestand uitgebreider is en de proefduur langer (1).

3. EVALUATIE VAN DE BLOOTSTELLING

3.1. De evaluatie van de blootstelling heeft ten doel te voorspellen welke concentratie van de stof in kwestie op langere termijn in het milieu zal worden aangetroffen. Deze concentratie wordt voorspelde concentratie in het milieu (predicted environmental concentration, PEC) genoemd. Het is evenwel mogelijk dat in bepaalde gevallen geen PEC kan worden vastgesteld en dat een kwalitatieve schatting van de blootstelling moet worden gemaakt.

3.2. Een PEC of, zo nodig, een kwalitatieve schatting van de blootstelling hoeft alleen te worden bepaald voor de milieucompartimenten, waarvan redelijkerwijs kan worden verwacht dat zij zullen worden belast als gevolg van emissies, lozingen, verwijdering of verspreidingsprocessen.

3.3. De schatting van de PEC of de kwalitatieve schatting van de blootstelling dient gebaseerd te worden op de overeenkomstig de bijlagen VII A, VII B, VII C of VIII van dit besluit in het technisch dossier verstrekte gegevens en in voorkomend geval met name op :

- i) adequate meetgegevens met betrekking tot de blootstelling;
- ii) de in de handel gebrachte hoeveelheden van de stof in kwestie;
- iii) de vorm waarin de stof in de handel wordt gebracht en/of gebruikt (b.v. in zuivere vorm of als bestanddeel van een preparaat);

iv) toepassingscategorieën en mate van inperking;

v) eventueel relevante procesgegevens;

vi) fysisch-chemische eigenschappen van de stof, in het bijzonder smeltpunt, kookpunt, dampspanning, oppervlaktespanning, oplosbaarheid in water, partiticoëfficiënt in n-octanol/water;

vii) de waarschijnlijke emissie-routes naar de milieucompartimenten alsmede het vermogen voor adsorptie/desorptie en afbraak;

viii) frequentie en duur van blootstelling.

3.4. Voor stoffen waarvan jaarlijks niet meer dan 10 ton (of in totaal niet meer dan 50 ton) in de handel wordt gebracht, wordt de PEC of kwalitatieve schatting van de blootstelling doorgaans bepaald voor het lokale milieucompartiment waarin de stof eventueel kan vrijkomen.

(1) Voor op de resultaten van acute-toxiciteitstests gebaseerde LC50- of EC50-waarden wordt doorgaans gewerkt met een beoordelingscoëfficiënt van de orde van 1 000, maar deze coëfficiënt kan worden verlaagd in het licht van andere relevante gegevens. Op NOEC-waarden gebaseerd op de resultaten van chronische-toxiciteitstests wordt meestal een lagere beoordelingscoëfficiënt toegepast.

iv) des données sur des substances structurellement analogues.

1.2. Si il considère qu'il y a raisonnablement lieu d'effectuer une caractérisation des risques pour une substance qui n'est pas classée dans la catégorie des substances dangereuses pour l'environnement et pour laquelle on ne dispose pas de données suffisantes concernant les effets sur les organismes (article 3, § 2, 3°, 2b), le Ministre applique, suivant le cas, l'article 3 § 2, 1°, 4b ou c.

2. EVALUATION DU RAPPORT DOSE (CONCENTRATION) - REPONSE (EFFET)

2.1. L'objectif est de déterminer quelle est la concentration au dessous de laquelle la substance ne devrait pas avoir d'effets indésirables sur la composante de l'environnement considérée. Cette concentration est appelée concentration prédite sans effet (PNEC).

2.2. La PNEC est déterminée à partir des informations contenues dans le dossier de notification relatives aux effets sur les organismes, prévues à la section 5 de l'annexe VII A ou de l'annexe VII B du présent arrêté, et dans les études écotoxicologiques visées à l'annexe VIII (niveaux 1 et 2) dudit arrêté.

2.3. Pour calculer la PNEC, on applique un facteur d'évaluation aux valeurs provenant des essais effectués sur les organismes, par exemple à la DL50 (dose létale médiane), à la CL50 (concentration létale médiane), à la CE50 (concentration effective médiane), à la CI50 (concentration provoquant 50 pourcent d'inhibition d'un paramètre donné, par exemple la croissance), au rapport NOEL(C) [dose sans effet observé (concentration)], ou au rapport LOEL(C) [dose (concentration) la plus faible entraînant l'effet observé].

2.4. Un facteur d'évaluation est l'expression du degré d'incertitude entachant l'extrapolation à l'environnement réel de résultats d'essais effectués sur un nombre limité d'espèces. Par conséquent, plus les données sont nombreuses et plus les essais sont longs, plus le degré d'incertitude et le facteur d'évaluation sont réduits (1).

3. EVALUATION DE L'EXPOSITION

3.1. L'objectif de l'évaluation de l'exposition est de déterminer quelle est la concentration à laquelle la substance sera finalement présente dans l'environnement. Cette concentration est appelée concentration prédite dans l'environnement (PEC). Toutefois, il se peut que dans certains cas, il ne soit pas possible d'établir une PEC, et il faut alors effectuer une estimation qualitative de l'exposition.

3.2. Il ne doit être procédé à la détermination d'une PEC ou, si nécessaire, à une estimation qualitative de l'exposition que pour les composantes de l'environnement susceptibles d'être exposées à des émissions, des rejets, des mises en décharge ou à des distributions.

3.3. La détermination de la PEC ou l'estimation qualitative de l'exposition est réalisée à partir des informations contenues dans le dossier technique comme prévu à l'annexe VII A, à l'annexe VII B, à l'annexe VII C ou à l'annexe VIII du présent arrêté, y compris, le cas échéant :

- i) des données d'exposition convenablement mesurées;
- ii) de la quantité de substance mise sur le marché;
- iii) de la forme sous laquelle la substance est commercialisée et/ou utilisée (par exemple, la substance en tant que telle ou incorporée dans une préparation);
- iv) des catégories d'utilisation et le degré de confinement;
- v) des données relatives aux procédés de production, si approprié;
- vi) des propriétés physico-chimiques de la substance, notamment le point de fusion, le point d'ébullition, la pression de vapeur, la tension superficielle, l'hydrosolubilité, le coefficient de partage n-octanol/eau;
- vii) des voies probables de transfert vers les composantes de l'environnement et le potentiel d'adsorption/desorption et de dégradation;
- viii) de la fréquence et de la durée de l'exposition.

3.4. Pour les substances mises sur le marché en quantités égales ou inférieures à 10 tonnes par an (ou 50 tonnes cumulées), il est habituellement procédé à la détermination de la PEC ou à l'estimation qualitative de l'exposition pour l'environnement local où la substance est susceptible d'être libérée.

(1) Un facteur d'évaluation de l'ordre de 1 000 est généralement appliqué à une valeur de la C(E)L 50 obtenue à partir des résultats des essais de toxicité aiguë, mais ce facteur peut être réduit à la lumière d'autres informations pertinentes. Un facteur d'évaluation inférieur est généralement appliqué à une NOEC obtenue à partir des résultats des essais de toxicité chronique.

4. KARAKTERISERING VAN HET RISICO

4.1. Voor elk beschouwd milieucompartiment omvat de karakterisering van het risico zo mogelijk een vergelijking van de PEC met de PNEC waarbij de verhouding van PEC en PNEC wordt berekend. Indien de PEC/PNEC-verhouding niet groter is dan één, is de in artikel 3, § 2, 1°, 4a, genoemde conclusie van toepassing. Indien de bedoelde verhouding groter is dan één dient de Minister op basis van de grootte daarvan, alsmede op basis van andere relevante gegevens zoals die welke in punt 1.1., onder i) tot en met iv), zijn genoemd, te bepalen welke van de in artikel 3, § 2, 1°, 4 b, c tot en met d, genoemde conclusies van toepassing is.

4.2. Als het niet mogelijk is gebleken een PEC/PNEC-verhouding te berekenen, dient de karakterisering van het risico een kwalitatieve inschatting te omvatten van de kans dat zich in de te verwachten omstandigheden van blootstelling een effect voordoet. Nadat hij deze beoordeling heeft uitgevoerd, bepaalt de Minister, rekening houdend met relevante factoren zoals die welke in punt 1.1 zijn genoemd, welke van de vier in art. 3, § 2, 1°, 4, genoemde conclusies van toepassing is.

5. SYNTHESE

5.1. Overeenkomstig het bepaalde in artikel 3, § 2, 3°, 1, kan een karakterisering van het risico worden uitgevoerd met betrekking tot meer dan één milieucompartiment. In dergelijke gevallen bepaalt de Minister voor ieder compartiment afzonderlijk welke van de vier in art. 3, § 2, 1°, 4 genoemde conclusies van toepassing is. Nadat de beoordeling van het risico is voltooid, onderwerpt de Minister de diverse conclusies aan een grondig onderzoek en formuleert hij eindconclusies waarin met alle milieu-effecten van de stof rekening wordt gehouden.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De Staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

BIJLAGE ERB IV**ALGEMENE SYNTHESE VAN DE CONCLUSIES**

1. De Minister dient de overeenkomstig punt 5.1. van bijlage ERB I, punt 4.1, van bijlage ERB II en punt 5.1, van bijlage ERB III opgestelde eindconclusies te evalueren en te integreren met het oog op het totaalbeeld van de door de risicobeoordeling aan het licht gebrachte risico's.

2. Indien aanvullende gegevens zijn vereist (artikel 3, § 2, 1°, 4b en c) of aanbevelingen ter beperking van het risico worden gedaan (artikel 3, § 2, 1°, 4d), dient dit te worden gemotiveerd. In laatstgenoemd geval dient rekening te worden gehouden met artikel 3, § 2, 1°, 6.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPO

De Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTE

De Minister van Volksgezondheid,
M. COLLA

De Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMET

De Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTEN

De staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

4. CARACTERISATION DES RISQUES

4.1. Pour une composante de l'environnement donnée, la caractérisation du risque implique, dans la mesure du possible, la comparaison entre la PEC et la PNEC de façon à obtenir un rapport PEC/PNEC. Si le rapport PEC/PNEC est égal ou inférieur à un, la conclusion de l'article 3, § 2, 1°, 4a, s'impose. Si le rapport est supérieur à un, le Ministre détermine, sur la base de la grandeur de ce rapport et d'autres facteurs pertinents, tels que ceux qui figurent aux points 1.1 i) à 1.1 iv), quelle est, parmi les conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4 b, c ou d, celle qui s'impose.

4.2. S'il n'a pas été possible de déterminer un rapport PEC/PNEC, la caractérisation du risque comporte une évaluation qualitative de la probabilité d'apparition d'un effet dans les conditions prévues d'exposition. Après avoir procédé à une telle évaluation et compte tenu de facteurs pertinents tels que ceux qui figurent au point 1.1, le Ministre détermine quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4 celle qui s'impose.

5. INTEGRATION

5.1. Conformément aux dispositions de l'article 3, § 2, 3°, 1, une caractérisation du risque peut être effectuée pour plusieurs composantes de l'environnement. En de tels cas, le Ministre détermine quelle est, parmi les quatre conclusions énumérées à l'article 3, § 2, 1°, 4, celle qui s'impose pour chaque composante. Une fois l'évaluation des risques terminée, le Ministre revoit les différentes conclusions et fournit des conclusions intégrées concernant les effets globaux de la substance sur l'environnement.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

ANNEXE ERB IV**INTEGRATION GENERALE DES CONCLUSIONS**

1. Les conclusions élaborées conformément au point 5.1. de l'annexe ERB I, au point 4.1. de l'annexe ERB II et au point 5.1. de l'annexe ERB III sont revues par le Ministre et intégrées pour l'ensemble des risques identifiés dans l'évaluation des risques.

2. Les demandes d'informations complémentaires (article 3, paragraphe 2, 1°, 4b et c) ou les recommandations concernant la réduction des risques (article 3, paragraphe 2, 1°, 4d), doivent être justifiées. Ces dernières tiendront compte de l'article 3, paragraphe 2, 1°, 6.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPO

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTE

Le Ministre de la Santé publique,
M. COLLA

La Ministre de l'Emploi et Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture
et des Petites et Moyennes Entreprises,
K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS

BIJLAGE ERB V

IN HET SAMENVATTEND RAPPORT
OVER DE RISICOBEOORDELING OP TE NEMEN GEGEVENS

1. Het schriftelijk rapport dat krachtens art. 3, § 2, 5° bij de Europese Commissie moet worden ingediend, dient de volgende elementen te omvatten :

i) een algemene samenvatting van de overeenkomstig art. 3, § 2, 4° en conform bijlage ERB IV getrokken conclusies;

ii) indien de in artikel 3, § 2, 1°, 4a, genoemde conclusie op de stof van toepassing is met betrekking tot alle potentiële schadelijke effecten, menselijke populaties en milieucompartimenten : een verklaring dat de stof in het licht van de beschikbare gegevens niet meteen aanleiding geeft tot bezorgdheid en niet verder in aanmerking hoeft te worden genomen totdat de kennisgever overeenkomstig artikel 2, § 1, 2°, artikel 2, § 2, 3°, of artikel 2, § 9, 1° van dit besluit aanvullende gegevens verstrekt;

iii) indien één van de in artikel 3, § 2, 1°, 4b of c genoemde conclusies van toepassing is met betrekking tot een of meer potentiële schadelijke effecten, menselijke populaties of milieucompartimenten : een omschrijving van de vereiste aanvullende gegevens en motivering van de noodzaak daarvan;

iv) indien de in artikel 3, § 2, 1°, 4d, genoemde conclusie van toepassing is met betrekking tot een of meer potentiële schadelijke effecten, menselijke populaties of milieucompartimenten : een omschrijving en motivering van de aanbevelingen ter beperking van het risico;

v) indien de in artikel 3, § 2, 1°, 5 bedoelde maatregel is genomen : een samenvatting van de door de kennisgever gegeven commentaar bij de voorstellen van de Minister alsmede van alle relevante aanvullende gegevens die zijn verstrekt.

2. Indien bij de karakterisering gebruik is gemaakt van verhoudingen tussen blootstellingsniveau en effect zoals beschreven in deel 4 van bijlage ERB IB en deel 4 van bijlage ERB III of gebruik is gemaakt van beoordelingscoëfficiënten zoals beschreven in deel 2 van bijlage ERB III dienen de betreffende verhoudingen of coëfficiënten te worden vermeld.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 13 november 1997.

ALBERT

Van Koningswege :

De Vice-Eerste Minister en Minister van Economie,
E. DI RUPODe Vice-Eerste Minister en Minister van Binnenlandse Zaken,
J. VANDE LANOTTEDe Minister van Volksgezondheid,
M. COLLADe Minister van Tewerkstelling en Arbeid,
Mevr. M. SMETDe Minister van Landbouw
en de Kleine en Middelgrote Ondernemingen,
K. PINXTENDe staatssecretaris voor Leefmilieu,
J. PEETERS

ANNEXE ERB V

INFORMATIONS DEVANT FIGURER DANS LE RESUME
DE L'EVALUATION DES RISQUES

1. Le rapport écrit transmis à la Commission européenne conformément à l'art. 3, § 2, 5° contient les éléments suivants :

i) un résumé général des conclusions élaborées conformément à l'art. 3, § 2, 4° et conformément à l'annexe ERB IV;

ii) si la conclusion prévue à l'article 3, § 2, 1°, 4a, s'applique à la substance pour tous les effets indésirables potentiels, toutes les catégories de population humaine et toutes les composantes de l'environnement, une déclaration attestant que, d'après les informations disponibles, la substance ne pose pas de problème dans l'immédiat et qu'une étude plus poussée n'est pas nécessaire tant que le notifiant ne communique pas d'informations complémentaires conformément à l'article 2, paragraphe 1er, 2°, à l'article 2, paragraphe 2, 3° ou l'article 2, paragraphe 9, 1° du présent arrêté;

iii) si la conclusion prévue à l'article 3, paragraphe 2, 1°, 4b ou c s'impose pour un ou plusieurs effets indésirables potentiels, une ou plusieurs catégories de population humaine ou une ou plusieurs composantes de l'environnement, une description et une justification des informations complémentaires exigées;

iv) si la conclusion prévue à l'article 3, paragraphe 2, 1°, 4d, s'impose pour un ou plusieurs effets indésirables potentiels, une ou plusieurs catégories de population humaine ou une ou plusieurs composantes de l'environnement, une description et une justification des recommandations concernant la réduction des risques;

v) si l'article 3, paragraphe 2, 1°, 5 a été appliqué, un résumé des observations formulées par le notifiant au sujet des propositions du Ministre et de toutes autres informations pertinentes fournies.

2. Lorsque la caractérisation des risques a entraîné l'utilisation des rapports niveau d'exposition/effet prévus à la section 4 de l'annexe ERB I B et à la section 4 de l'annexe ERB III ou l'utilisation des facteurs d'évaluation décrits à la section 2 de l'annexe ERB III, ces rapports ou facteurs sont précisés.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 13 novembre 1997.

ALBERT

Par le Roi :

Le Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Economie,
E. DI RUPOLe Vice-Premier Ministre et Ministre de l'Intérieur,
J. VANDE LANOTTELe Ministre de la Santé publique,
M. COLLALa Ministre de l'Emploi et du Travail,
Mme M. SMET

Le Ministre de l'Agriculture et des Petites et Moyennes Entreprises,

K. PINXTEN

Le Secrétaire d'Etat à l'Environnement,
J. PEETERS