

# WETTEN, DECRETEN, ORDONNANTIES EN VERORDENINGEN

## LOIS, DECRETS, ORDONNANCES ET REGLEMENTS

MINISTERIE VAN SOCIALE ZAKEN,  
VOLKSGEZONDHEID EN LEEFMILIEU

N. 2000 — 858

[C — 2000/22155]

**4 FEBRUARI 2000.** — 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 21 december 1998 betreffende de productnormen ter bevordering van duurzame productie- en consumptiepatronen en ter bescherming van het leefmilieu en de volksgezondheid, inzonderheid artikel 5, § 1, eerste lid, 5°;

Gelet op de richtlijn 98/73/EG van de Commissie van 18 september 1998 tot vierentwintigste aanpassing aan de vooruitgang van de techniek 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;

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, 19 juli 1994, 13 november 1997, 14 december 1998 en 25 november 1999;

Gelet op de omstandigheid dat de gewestregeringen bij het ontwerpen van dit besluit betrokken zijn;

Gelet op het advies van de Federale Raad voor Duurzame Ontwikkeling van 30 juni 1999;

Gelet op het advies van de Hoge Gezondheidsraad van 15 september 1999;

Gelet op het advies van de Raad voor het Verbruik van 6 juli 1999;

Gelet op het advies van de Centrale Raad voor het Bedrijfsleven van 2 augustus 1999;

Gelet op het advies van de Raad van State gegeven op 21 december 1999;

Overwegende de noodzakelijkheid gevolg te geven aan de bepalingen in de richtlijn 98/73/EG die ten laatste op 31 oktober 1999 moet zijn omgezet;

Op de voordracht van Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Hebben Wij besloten en besluiten Wij :

**Artikel 1.** In bijlage V bij 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 september 1989, 13 november 1997 en 14 december 1998, worden de volgende wijzigingen aangebracht :

1° de tekst van de bijlagen I, II en III bij dit besluit wordt toegevoegd aan deel A van die bijlage V;

2° de tekst van bijlage IV bij dit besluit wordt toegevoegd aan deel C van die bijlage V.

**Art. 2.** Onze Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu is belast met de uitvoering van dit besluit.

Gegeven te Brussel, 4 februari 2000.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken,  
Volksgezondheid en Leefmilieu,  
Mevr. M. AELVOET

MINISTERE DES AFFAIRES SOCIALES,  
DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT

F. 2000 — 858

[C — 2000/22155]

**4 FEVRIER 2000.** — 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 21 décembre 1998 relative aux normes de produits ayant pour but la promotion de modes de production et de consommation durables et la protection de l'environnement et de la santé, notamment l'article 5, § 1<sup>er</sup> premier alinéa, 5°;

Vu la directive 98/73/CE de la Commission du 18 septembre 1998 portant vingt-quatrième 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;

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, 19 juillet 1994, 13 novembre 1997, 14 décembre 1998 et 25 novembre 1999;

Vu l'association des gouvernements de région à l'élaboration du présent arrêté;

Vu l'avis du Conseil Fédéral du Développement durable du 30 juin 1999;

Vu l'avis du Conseil supérieur d'Hygiène publique du 15 septembre 1999;

Vu l'avis du Conseil de la Consommation du 6 juillet 1999;

Vu l'avis du Conseil central de l'Economie du 2 août 1999;

Vu l'avis du Conseil d'Etat, donné le 21 décembre 1999;

Considérant la nécessité de satisfaire aux dispositions de la directive 98/73/CE qui doit être transposée au plus tard le 31 octobre 1999;

Sur la proposition de Notre Ministre de la Protection de la consommation, de la Santé publique et de l'Environnement,

Nous avons arrêté et arrêtons :

**Article 1<sup>er</sup>.** Les modifications suivantes sont apportées à l'annexe V 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 septembre 1989, 13 novembre 1997 et 14 décembre 1998 :

1° le texte des annexes I, II et III du présent arrêté est ajouté à la fin de cette annexe V partie A;

2° le texte de l'annexe IV du présent arrêté est ajouté à la fin de cette annexe V partie C.

**Art. 2.** Notre Ministre de la Protection de la consommation, de la Santé publique et de l'Environnement est chargée de l'exécution du présent arrêté.

Donné à Bruxelles, le 4 février 2000.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,  
Mme M. AELVOET

## BIJLAGE I

## A.18. AANTALGEMIDDELD MOLECUULGEWICHT EN MOLECUULGEWICHTSVERDELING VAN POLYMEREN

## 1. METHODE

Deze methode voor gelpermeatiechromatografie is overgenomen van TG 118 van de OESO (1996). Voor de fundamentele beginselen en nadere technische informatie wordt verwezen naar de referenties.

## 1.1. Inleiding

Aangezien de eigenschappen van polymeren zo sterk uiteenlopen, is het onmogelijk een enkele methode te beschrijven waarin voor alle mogelijkheden en specifieke gevallen bij de scheiding van polymeren exact de omstandigheden voor scheiding en evaluatie worden aangegeven. Met name complexe polymeersystemen komen vaak niet in aanmerking voor gelpermeatiechromatografie (GPC). Wanneer GPC niet uitvoerbaar is, kan het molecuulgewicht met behulp van andere methoden worden bepaald (zie bijlage). In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

De hier beschreven methode is gebaseerd op de norm DIN 55672 (1). Deze norm bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop de experimenten moeten worden uitgevoerd en de gegevens moeten worden geëvalueerd. Wanneer veranderingen in de wijze van uitvoering nodig zijn, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Ook andere normen kunnen worden gebruikt, mits de referenties volledig worden vermeld. In de beschreven methode worden voor de kalibratie polystyreenmonsters met een bekende polydispersiteit gebruikt en wijzigingen kunnen nodig zijn om de methode geschikt te maken voor bepaalde polymeren zoals in water oplosbare polymeren en vertakte polymeren met een lange keten.

## 1.2. Definities en eenheden

Het aantalgemiddeld molecuulgewicht ( $M_n$ ) en het gewichtgemiddeld molecuulgewicht ( $M_w$ ) worden bepaald met behulp van de volgende vergelijkingen :

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

waarbij

$H_i$  = de hoogte van het detectorsignaal vanaf de basislijn bij het retentievolume  $V_i$ ;

$M_i$  = het molecuulgewicht van de polymeerfractie bij het retentievolume  $V_i$ ;

$n$  = het aantal meetpunten.

De verhouding  $M_w/M_n$  is de breedte van de molecuulgewichtsverdeling, die een maat is voor de dispersiteit van het systeem.

## 1.3. Referentiestoffen

Aangezien GPC een relatieve methode is, moet het systeem worden gekalibreerd. Als standaard worden normaal gesproken fijn verdeelde lineair opgebouwde polystyreenmonsters gebruikt met bekende gemiddelde molecuulgewichten ( $M_n$  en  $M_w$ ) en een bekende molecuulgewichtsverdeling. De kalibratiecurve kan alleen voor de bepaling van het molecuulgewicht van het onbekende monster worden gebruikt als de omstandigheden voor de scheiding van het monster en de standaards op identieke wijze zijn gekozen.

Een tijdens een bepaald experiment vastgesteld verband tussen het molecuulgewicht en het elutievolume is alleen onder de specifieke omstandigheden van dat experiment geldig. Daarbij gaat het vooral om de temperatuur, het oplosmiddel (of het oplosmiddelenmengsel), de omstandigheden tijdens chromatografie en de kolom of het kolomsysteem waarop de scheiding is uitgevoerd.

Een op deze manier bepaald molecuulgewicht van het monster is relatief en wordt beschreven als een „polystyreen-equivalent molecuulgewicht“. Dit houdt in dat het molecuulgewicht afhankelijk van de structurele en chemische verschillen tussen het monster en de standaard in meer of mindere mate van de absolute waarde kan afwijken. Als een andere standaard wordt gebruikt, zoals polyethyleenglycol, polyethyleenoxide, polymethylmethacrylaat of polyacrylzuur, moet de reden daarvan worden vermeld.

## 1.4. Principe van de testmethode

Zowel de molecuulgewichtsverdeling van het monster als het gemiddelde molecuulgewicht ( $M_n$  of  $M_w$ ) kan met behulp van GPC worden bepaald. GPC is een speciaal soort vloeistofchromatografie waarbij het monster aan de hand van het hydrodynamisch volume van de verschillende bestanddelen wordt gescheiden (2).

De scheiding voltrekt zich tijdens de passage van het monster door een kolom die met een poreus materiaal, meestal een organische gel, is gevuld. Kleine moleculen kunnen de poriën binnendringen, terwijl grote moleculen dit niet kunnen. Grote moleculen volgen dan ook een kortere weg en worden het eerste geëluëerd. Middelgrote moleculen kunnen sommige poriën binnendringen en worden later geëluëerd. De kleinste moleculen, waarvan de gemiddelde hydrodynamische straal kleiner is dan de poriën van de gel, kunnen alle poriën binnendringen. Deze worden het laatste geëluëerd.

In het ideale geval wordt de scheiding uitsluitend door de grootte van het molecuul bepaald, maar enige storing door absorptie-effecten is in de praktijk vrijwel niet te voorkomen. Een ongelijkmatige pakking van de kolom en dode ruimtes kunnen de situatie nog ongunstiger maken (2).

Detectie gebeurt aan de hand van bijvoorbeeld de brekingsindex of UV-absorptie en levert een eenvoudige verdelingskromme op. Om echte waarden voor het molecuulgewicht aan de kromme te kunnen toekennen, moet de kolom echter worden gekalibreerd met behulp van polymeren met een bekend molecuulgewicht en liefst een in grote lijnen vergelijkbare structuur, bijvoorbeeld een aantal polystyreenstandaards. Meestal levert dit een Gauss-curve op, soms met een kleine staart aan de kant van de lage molecuulgewichten, waarbij op de verticale as de geëluëerde hoeveelheid in gewicht wordt uitgezet en op de horizontale as de logaritme van het molecuulgewicht.

### 1.5. Kwaliteitscriteria

De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van het elutievolume moet beter zijn dan 0,3 %. Indien een chromatogram tijdafhankelijk wordt geëvalueerd en niet aan dit criterium voldoet, moet door correctie met behulp van een interne standaard de vereiste herhaalbaarheid van de analyse worden gewaarborgd (1). De polydispersiteit is afhankelijk van het molecuulgewicht van de standaard. Normale waarden voor polystyreenstandaards zijn :

$M_p < 2\ 000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\ 000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

( $M_p$  is het molecuulgewicht van de standaard bij de top van de piek).

### 1.6. Beschrijving van de testmethode

#### 1.6.1. Bereiding van de polystyreen-standaardoplossingen

De polystyreenstandaard wordt opgelost door deze zorgvuldig te mengen in de gekozen elutievlloeistof. Bij de bereiding van de oplossingen moet rekening worden gehouden met de aanbevelingen van de fabrikant.

De concentratie van de standaardoplossingen wordt bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals het geïnjecteerde volume, de viscositeit van de oplossing en de gevoeligheid van de detector. Het maximale geïnjecteerde volume moet aan de lengte van de kolom worden aangepast om overlading te voorkomen. Voor een scheiding met behulp van GPC over een kolom van 30 cm x 7,8 mm wordt meestal een volume van 40 tot 100  $\mu$ l geïnjecteerd. Grotere volumes zijn mogelijk, maar niet groter dan 250  $\mu$ l. De optimale verhouding tussen het geïnjecteerde volume en de concentratie moet vóór de kalibratie van de kolom worden bepaald.

#### 1.6.2. Bereiding van de monsteroplossing

In beginsel gelden voor de bereiding van de monsteroplossingen dezelfde eisen. Het monster wordt door zorgvuldig schudden opgelost in een geschikt oplosmiddel, bijvoorbeeld tetrahydrofuraan (THF). Het mag in geen geval met behulp van een ultrasoon bad worden opgelost. Indien nodig wordt de monsteroplossing gezuiverd over een membraanfilter met een poriëgrootte tussen 0,2 en 2  $\mu$ m.

Indien de oplossing onopgeloste deeltjes bevat, moet dit in het eindverslag worden vermeld aangezien deze door hoogmoleculaire bestanddelen kunnen ontstaan. Er moet aan adequate methode worden gebruikt om het gewichtspercentage van de onopgeloste deeltjes te bepalen. De oplossingen moeten binnen 24 uur worden gebruikt.

#### 1.6.3. Apparatuur

- Oplosmiddelreservoir
- Ontgasser (indien van toepassing)
- Pomp
- Pulsdemper (indien van toepassing)
- Injectiesysteem
- Chromatografiekolommen
- Detector
- Stromingsmeter (indien van toepassing)
- Gegevensrecorder/verwerker
- Afvalreservoir.

Er moet voor worden gezorgd dat het GPC-systeem niet met de gebruikte oplosmiddelen reageert (bijvoorbeeld door stalen capillairen te gebruiken voor THF-oplossingen).

#### 1.6.4. Injectie- en oplosmiddeltoevoersysteem

Een bekend volume van de monsteroplossing wordt met behulp van een autosampler of manueel in een scherp begrensde zone op de kolom gebracht. Wanneer bij manueel opbrengen de plunjer van de injectiespuit te snel wordt ingedrukt of teruggetrokken, kan dit tot veranderingen in de waargenomen molecuulgewichtsverdeling leiden. Het oplosmiddeltoevoersysteem moet voorzover mogelijk pulsatievrij zijn en liefst een pulsdemper bevatten. De stroomsnelheid moet ongeveer 1 ml/min zijn.

#### 1.6.5. Kolom

Afhankelijk van het monster wordt het polymeer gekarakteriseerd met behulp van één kolom of een aantal in serie gekoppelde kolommen. In de handel zijn verschillende poreuze pakkingsmaterialen met bekende eigenschappen (bijvoorbeeld poriëgrootte en exclusiegrens) verkrijgbaar. De keuze van de gel en de lengte van de kolom wordt bepaald door zowel de eigenschappen van het monster (hydrodynamisch volume, molecuulgewichtsverdeling) als de specifieke omstandigheden voor de scheiding zoals oplosmiddel, temperatuur en stroomsnelheid (1) (2) (3).

#### 1.6.6. Theoretische schotels

De voor de scheiding gebruikte kolom of combinatie van kolommen moet worden gekarakteriseerd met behulp van het aantal theoretische schotels. Daartoe moet, indien THF als elutievlloeistof wordt gebruikt, een oplossing van ethylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof op een kolom met een bekende lengte worden gebracht. Het aantal theoretische schotels wordt berekend met de volgende vergelijking :

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{of} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

waarbij :

$N$  = het aantal theoretische schotels;

$V_e$  = het elutievolume bij de top van de piek;

$W$  = de piekbreedte aan de basis;

$W_{1/2}$  = de piekbreedte op halve hoogte.

### 1.6.7. *Scheidend vermogen*

Naast het aantal theoretische schotels, een grootheid die bepalend is voor de bandbreedte, speelt ook het scheidend vermogen, dat wordt bepaald door de helling van de kalibratiecurve, een rol. Het scheidend vermogen van een kolom kan als volgt worden bepaald :

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{oppervlak doorsnede van de kolom}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

waarbij :

$V_{e,M_x}$  = het elutievolume voor polystyreen met molecuulgewicht  $M_x$ ;

$V_{e,(10M_x)}$  = het elutievolume voor polystyreen met een tien keer zo hoog molecuulgewicht.

De resolutie van het systeem wordt meestal als volgt gedefinieerd :

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

waarbij :

$V_{e1}$ ,  $V_{e2}$  = het elutievolume van de twee polystyreenstandaards bij de top van de piek;

$W_1$ ,  $W_2$  = die piekbreedte aan de basis;

$M_1$ ,  $M_2$  = het molecuulgewicht bij de top van de pieken (deze moeten een factor 10 van elkaar verschillen).

De R-waarde voor het kolomsysteem moet groter zijn dan 1,7 (4).

### 1.6.8. *Oplosmiddelen*

Alle oplosmiddelen moeten zeer zuiver zijn (THF wordt gebruikt met een zuiverheid van 99,5 %). Het oplosmiddelreservoir (indien nodig onder inert gas) moet groot genoeg zijn voor de kalibratie van de kolom en de analyse van verschillende monsters. Het oplosmiddel moet worden ontgast voordat het via de pomp naar de kolom wordt getransporteerd.

### 1.6.9. *Temperatuurbewaking*

De temperatuur van de kritische interne onderdelen (injectieblok, kolommen, detector en leidingen) moet constant zijn en in overeenstemming zijn met het gekozen oplosmiddel.

### 1.6.10. *Detector*

De detector is bedoeld om de concentratie van het monster in het eluaat uit de kolom kwantitatief te registreren. Om een onnodige verbreding van de pieken te voorkomen, moet het volume van de meetcel van de detector zo klein mogelijk worden gehouden. Het volume mag niet groter zijn dan 10  $\mu\text{l}$ , behalve voor lichtverstrooiings- en viscositeitsdetectoren. Meestal wordt voor de detectie differentiële refractometrie gebruikt. Indien dit in verband met de specifieke eigenschappen van het monster of de elutievloeistof nodig is, kunnen echter ook andere soorten detectors worden gebruikt, zoals UV/VIS, IR of viscositeitsdetectoren.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1. *Gegevens*

Voor de gedetailleerde beoordelingscriteria en voor de eisen ten aanzien van het verzamelen en bewerken van de gegevens wordt verwezen naar de DIN-norm (1).

Voor elk monster moeten twee onafhankelijke experimenten worden uitgevoerd die los van elkaar moeten worden geanalyseerd.

Voor elke meting moet de waarde van  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  en  $M_p$  worden vermeld. Daarbij moet expliciet worden vermeld dat de gemeten waarden relatief zijn en worden uitgedrukt in equivalent-molecuulgewicht van de gebruikte standaard.

Na de bepaling van de retentievolumes of de retentietijden (eventueel gecorrigeerd met behulp van een interne standaard) wordt de logaritmische waarde van  $M_p$  (waarbij  $M_p$  de top van de piek van de kalibratiestandaard is) tegen een van deze grootheden uitgezet. Per log-interval zijn minimaal twee kalibratiepunten nodig en voor de curve als geheel minimaal vijf meetpunten. Het geraamde molecuulgewicht van het monster moet tussen het eerste en het laatste meetpunt liggen. Voor de bepaling van het laagste molecuulgewicht van de kalibratiecurve wordt een oplossing van n-hexylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof gebruikt. Het aantalgemiddelde en het gewichtgemiddelde molecuulgewicht worden meestal aan de hand van de bij punt 1.2 vermelde vergelijkingen met behulp van een computer bepaald. Wanneer de digitalisering met de hand gebeurt, kan ASTM D 3536-91 (3) worden geraadpleegd.

De verdelingskromme moet in de vorm van een tabel of als figuur (al dan niet cumulatieve frequentieverdeling tegen  $\log M$ ) worden verstrekt. Bij de grafische weergave moet één log-interval van het molecuulgewicht normaal gesproken ongeveer 4 cm breed zijn en moet de top van de piek ongeveer 8 cm hoog zijn. Bij een cumulatieve frequentieverdeling moet het verschil op de y-as tussen 0 en 100 % ongeveer 10 cm zijn.

### 2.2. *Testverslag*

Het testverslag moet de volgende informatie bevatten :

#### 2.2.1. *Onderzochte stof*

— Beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen).

— Beschrijving van de behandeling van het monster, opmerkingen, problemen.

### 2.2.2. Apparatuur

- Elutievloeistofreservoir, inert gas, ontgassing van de elutievloeistof, samenstelling van de elutievloeistof, verontreinigingen.
- Pomp, pulsdemper, injectiesysteem.
- Scheidingskolommen (fabrikant, alle informatie over de kenmerken van de kolommen zoals poriegrootte en aard van het pakkingsmateriaal, aantal, lengte en volgorde van de gebruikte kolommen).
- Aantal theoretische schotels van de kolom (of de combinatie), scheidend vermogen (resolutie van het systeem).
- Informatie over de symmetrie van de pieken.
- Kolomtemperatuur, aard van de temperatuurregeling.
- Detector (meetprincipe, type, volume van de meetcel).
- Stromingsmeter, indien gebruikt (fabrikant, meetprincipe).
- Systeem voor gegevensregistratie en -verwerking (hardware en software).

### 2.2.3. Kalibratie van het systeem

- Gedetailleerde beschrijving van de methode die wordt gebruikt om de kalibratiecurve samen te stellen.
- Informatie over de kwaliteitscriteria voor deze methode (bijvoorbeeld correlatiecoëfficiënt of som van de kwadraten).
- Informatie over alle extrapolaties, veronderstellingen en benaderingen tijdens de experimentele procedure en de beoordeling en verwerking van gegevens.
- Alle metingen die voor de samenstelling van de kalibratiecurve worden gebruikt, moeten in een tabel worden opgenomen waarbij voor elk kalibratiepunt de volgende informatie moet worden vermeld :
  - naam van het monster;
  - fabrikant van het monster;
  - normale waarden van  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  en  $M_w/M_n$ , zoals deze door de fabrikant zijn verstrekt of door latere metingen zijn bepaald, alsmede gedetailleerde informatie over de bepalingmethode;
  - geïnjecteerd volume en concentratie daarin;
  - voor kalibratie gebruikte waarde van  $M_p$ ;
  - bij de top van de piek gemeten elutievolume of gecorrigeerde retentietijd;
  - bij de top van de piek berekende  $M_p$ ;
  - procentuele fout van berekende  $M_p$  en de kalibratiewaarde.

### 2.2.4. Evaluatie

- Evaluatie op basis van tijd : methoden die worden gebruikt om de vereiste reproduceerbaarheid te waarborgen (correctiemethode, interne standaard, enz.).
- Informatie over de keuze voor elutievolume of retentietijd als basis voor de evaluatie.
- Informatie over de grenzen van de evaluatie als een piek niet volledig wordt geanalyseerd.
- Beschrijving van afvlakmethoden indien deze zijn gebruikt.
- Procedures voor de bereiding en voorbehandeling van het monster.
- Eventuele aanwezigheid van onopgeloste deeltjes.
- Geïnjecteerd volume ( $\mu\text{l}$ ) en concentratie daarin ( $\text{mg/ml}$ ).
- Bespreking van effecten die tot afwijkingen van het ideale GPC-profiel leiden.
- Gedetailleerde beschrijving van alle wijzigingen in de testprocedures.
- Gedetailleerde informatie over de foutintervallen.
- Alle andere informatie en opmerkingen die relevant zijn voor de interpretatie van de resultaten.

## 3. REFERENTIES

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

*Bijlage***Voorbeelden van andere methoden voor de bepaling van het aantalgemiddelde molecuulgewicht ( $M_n$ ) van polymeren**

Gelpermeatiechromatografie (GPC) geniet de voorkeur als methode voor de bepaling van  $M_n$ , vooral wanneer er verschillende standaards beschikbaar zijn waarvan de structuur vergelijkbaar is met die van het polymeer. Wanneer het gebruik van GPC praktische problemen oplevert of reeds wordt vermoed dat de stof niet aan een criterium voor  $M_n$  in de regelgeving zal voldoen (en dit vermoeden moet worden bevestigd), zijn echter andere methoden beschikbaar :

**1. Gebruik van colligatieve eigenschappen**

1.1. *Ebullioscopie/Cryoscopie* : Hierbij wordt de kookpuntverhoging (ebullioscopie) of vriespuntverlaging (cryoscopie) van een oplosmiddel na toevoeging van het polymeer gemeten. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van het feit dat het effect van het opgeloste polymeer op het kookpunt/vriespunt van de vloeistof afhankelijk is van het molecuulgewicht van het polymeer (1) (2).

Toepasbaarheid :  $M_n < 20\ 000$ .

1.2. *Dampspanningsverlaging* : Hierbij wordt de dampspanning van een gekozen referentievloeistof voor en na toevoeging van bekende hoeveelheden polymeer gemeten (1) (2).

Toepasbaarheid :  $M_n < 20\ 000$  (theoretisch; in de praktijk is de bruikbaarheid van deze methode beperkt).

1.3. *Membraan-osmometrie* : Berust op osmose, d.w.z. de natuurlijke neiging van moleculen van oplosmiddelen om zich via een semipermeabel membraan van een verdunde naar een geconcentreerde oplossing te verplaatsen om een evenwicht te bereiken. In dit geval bevat de verdunde oplossing geen polymeer en de geconcentreerde oplossing wel. Doordat het oplosmiddel door het membraan wordt getrokken, ontstaat een drukverschil dat afhankelijk is van de concentratie en het molecuulgewicht van het polymeer (1) (3) (4).

Toepasbaarheid :  $20\ 000 < M_n < 200\ 000$ .

1.4. *Dampfase-osmometrie* : Hierbij wordt de verdampingssnelheid van een zuivere oplosmiddelaërosol vergeleken met die van ten minste drie aërosolen die verschillende concentraties polymeer bevatten (1) (5) (6).

Toepasbaarheid :  $M_n < 20\ 000$ .

**2. Eindgroepanalyse**

Om deze methode te kunnen gebruiken is kennis nodig omtrent zowel de algehele structuur van het polymeer als de aard van de eindgroepen die de ketens afsluiten (deze moeten met behulp van bijvoorbeeld NMR of titratie/derivatisering van de hoofdketen kunnen worden onderscheiden). Wanneer de concentratie van de eindgroepen in het polymeermolecuul wordt bepaald, kan op grond daarvan een waarde voor het molecuulgewicht worden afgeleid (7) (8) (9).

Toepasbaarheid :  $M_n$  tot 50 000 (met afnemende betrouwbaarheid).

**REFERENTIES**

- (1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In : Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- (3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In : Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
- (5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure Osmometry. In : Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In : Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 4 februari 2000.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

## BIJLAGE II

## A.19. GEHALTE VAN POLYMEREN AAN LAAGMOLECULAIRE BESTANDDELEN

## 1. METHODE

Deze methode voor gelpermeatiechromatografie is overgenomen van TG 119 van de OESO (1996). Voor de fundamentele beginselen en nadere technische informatie wordt verwezen naar de referenties.

## 1.1. Inleiding

Aangezien de eigenschappen van polymeren zo sterk uiteenlopen, is het onmogelijk een enkele methode te beschrijven waarin voor alle mogelijkheden en specifieke gevallen bij de scheiding van polymeren exact de omstandigheden voor scheiding en evaluatie worden aangegeven. Met name complexe polymeersystemen komen vaak niet in aanmerking voor gelpermeatiechromatografie (GPC). Wanneer GPC niet uitvoerbaar is, kan het molecuulgewicht met behulp van andere methoden worden bepaald (zie bijlage). In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

De hier beschreven methode is gebaseerd op de norm DIN 55672 (1). Deze norm bevat gedetailleerde informatie over de wijze waarop de experimenten moeten worden uitgevoerd en de gegevens moeten worden geëvalueerd. Wanneer veranderingen in de wijze van uitvoering nodig zijn, moet daarvoor een motivering worden gegeven. Ook andere normen kunnen worden gebruikt, mits de referenties volledig worden vermeld. In de beschreven methode worden voor de kalibratie polystyreenmonsters met een bekende polydispersiteit gebruikt en wijzigingen kunnen nodig zijn om de methode geschikt te maken voor bepaalde polymeren zoals in water oplosbare polymeren en vertakte polymeren met een lange keten.

## 1.2. Definities en eenheden

Een laag molecuulgewicht wordt hier willekeurig gedefinieerd als een molecuulgewicht beneden 1 000 dalton.

Het aantalgemiddelde molecuulgewicht ( $M_n$ ) en het gewichtgemiddelde molecuulgewicht ( $M_w$ ) worden bepaald met behulp van de volgende vergelijkingen :

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

waarbij :

$H_i$  = de hoogte van het detectorsignaal vanaf de basislijn bij het retentievolume  $V_i$ ;

$M_i$  = het molecuulgewicht van de polymeerfractie bij het retentievolume  $V_i$ ;

$n$  = het aantal meetpunten.

De verhouding  $M_w/M_n$  is de breedte van de molecuulgewichtsverdeling, die een maat is voor de dispersiteit van het systeem.

## 1.3. Referentiestoffen

Aangezien GPC een relatieve methode is, moet het systeem worden gekalibreerd. Als standaard worden normaal gesproken fijn verdeelde lineair opgebouwde polystyreenmonsters gebruikt met bekende gemiddelde molecuulgewichten ( $M_n$  en  $M_w$ ) en een bekende molecuulgewichtsverdeling. De kalibratiecurve kan alleen voor de bepaling van het molecuulgewicht van het onbekende monster worden gebruikt als de omstandigheden voor de scheiding van het monster en de standards op identieke wijze zijn gekozen.

Een tijdens een bepaald experiment vastgesteld verband tussen het molecuulgewicht en het elutievolume is alleen onder de specifieke omstandigheden van dat experiment geldig. Daarbij gaat het vooral om de temperatuur, het oplosmiddel (of het oplosmiddelenmengsel), de omstandigheden tijdens chromatografie en de kolom of het kolomsysteem waarop de scheiding is uitgevoerd.

Een op deze manier bepaald molecuulgewicht van het monster is relatief en wordt beschreven als een „polystyreen-equivalent molecuulgewicht“. Dit houdt in dat het molecuulgewicht afhankelijk van de structurele en chemische verschillen tussen het monster en de standaard in meer of mindere mate van de absolute waarde kan afwijken. Als een andere standaard wordt gebruikt, zoals polyethyleenglycol, polyethyleenoxide, polymethylmethacrylaat of polyacrylzuur, moet de reden daarvan worden vermeld.

## 1.4. Principe van de testmethode

Zowel de molecuulgewichtsverdeling van het monster als het gemiddelde molecuulgewicht ( $M_n$  of  $M_w$ ) kan met behulp van GPC worden bepaald. GPC is een speciaal soort vloeistofchromatografie waarbij het monster aan de hand van het hydrodynamische volume van de verschillende bestanddelen wordt gescheiden (2).

De scheiding voltrekt zich tijdens de passage van het monster door een kolom die met een poreus materiaal, meestal een organische gel, is gevuld. Kleine moleculen kunnen de poriën binnendringen, terwijl grote moleculen dit niet kunnen. Grote moleculen volgen dan ook een kortere weg en worden het eerste geëluëerd. Middelgrote moleculen kunnen sommige poriën binnendringen en worden later geëluëerd. De kleinste moleculen, waarvan de gemiddelde hydrodynamische straal kleiner is dan de poriën van de gel, kunnen alle poriën binnendringen. Deze worden het laatste geëluëerd.

In het ideale geval wordt de scheiding uitsluitend door de grootte van het molecuul bepaald, maar enige storing door absorptie-effecten is in de praktijk vrijwel niet te voorkomen. Een ongelijkmatige pakking van de kolom en dode ruimtes kunnen de situatie nog ongunstiger maken (2).

Detectie gebeurt aan de hand van bijvoorbeeld de brekingsindex of UV-absorptie en levert een eenvoudige verdelingskromme op. Om echte waarden voor het molecuulgewicht aan de kromme te kunnen toekennen, moet de kolom echter worden gekalibreerd met behulp van polymeren met een bekend molecuulgewicht en liefst een in grote lijnen vergelijkbare structuur, bijvoorbeeld een aantal polystyreenstandaards. Meestal levert dit een Gauss-curve op, soms met een kleine staart aan de kant van de lage molecuulgewichten, waarbij op de verticale as de geëluëerde hoeveelheid in gewicht wordt uitgezet en op de horizontale as de logaritme van het molecuulgewicht.

Het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen wordt uit deze kromme afgeleid. De kalibratie kan alleen nauwkeurig zijn als de respons van de laagmoleculaire bestanddelen per massa-eenheid equivalent is met die van het polymeer als geheel.

### 1.5. Kwaliteitscriteria

De herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking) van het elutievolume moet beter zijn dan 0,3 %. Indien een chromatogram tijdafhankelijk wordt geëvalueerd en niet aan dit criterium voldoet, moet door correctie met behulp van een interne standaard de vereiste herhaalbaarheid van de analyse worden gewaarborgd (1). De polydispersiteit is afhankelijk van het molecuulgewicht van de standaard. Normale waarden voor polystyreenstandaards zijn :

$M_p < 2\ 000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\ 000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

( $M_p$  is het molecuulgewicht van de standaard bij de top van de piek).

### 1.6. Beschrijving van de testmethode

#### 1.6.1. Bereiding van de polystyreen-standaardoplossingen

De polystyreenstandaard wordt opgelost door deze zorgvuldig te mengen in de gekozen elutievlloeistof. Bij de bereiding van de oplossingen moet rekening worden gehouden met de aanbevelingen van de fabrikant.

De concentratie van de standaardoplossingen wordt bepaald aan de hand van verschillende factoren, zoals het geïnjecteerde volume, de viscositeit van de oplossing en de gevoeligheid van de detector. Het maximale geïnjecteerde volume moet aan de lengte van de kolom worden aangepast om overlading te voorkomen. Voor een scheiding met behulp van GPC over een kolom van 30 cm x 7,8 mm wordt meestal een volume van 40 tot 100  $\mu$ l geïnjecteerd. Grotere volumes zijn mogelijk, maar niet groter dan 250  $\mu$ l. De optimale verhouding tussen het geïnjecteerde volume en de concentratie moet vóór de kalibratie van de kolom worden bepaald.

#### 1.6.2. Bereiding van de monsteroplossing

In beginsel gelden voor de bereiding van de monsteroplossingen dezelfde eisen. Het monster wordt door zorgvuldig schudden opgelost in een geschikt oplosmiddel, bijvoorbeeld tetrahydrofuraan (THF). Het mag in geen geval met behulp van een ultrasoon bad worden opgelost. Indien nodig wordt de monsteroplossing gezuiverd over een membraanfilter met een poriegrootte tussen 0,2 en 2  $\mu$ m.

Indien de oplossing onopgeloste deeltjes bevat, moet dit in het eindverslag worden vermeld aangezien deze door hoogmoleculaire bestanddelen kunnen ontstaan. Er moet een adequate methode worden gebruikt om het gewichtspercentage van de onopgeloste deeltjes te bepalen. De oplossingen moeten binnen 24 uur worden gebruikt.

#### 1.6.3. Correctie voor het gehalte aan verontreinigingen en additieven

Meestal moet het gehalte aan bestanddelen met  $M < 1\ 000$  worden gecorrigeerd voor de bijdrage van niet polymerspecifieke componenten (zoals verontreinigingen en/of additieven), tenzij het gemeten gehalte al lager is dan 1 %. Dit gebeurt door een directe analyse van de polymereoplossing of van het GPC-eluaat.

Wanneer het eluaat na de passage door de kolom te verdund is om nog te worden geanalyseerd, moet het worden geconcentreerd. Daarbij kan het nodig zijn het eluaat droog te dampen en vervolgens weer op te lossen. Het concentreren van het eluaat moet onder zodanige omstandigheden gebeuren dat wordt gewaarborgd dat er geen veranderingen in het eluaat optreden. De behandeling van het eluaat na GPC is afhankelijk van de analysemethode die voor de kwantitatieve bepaling wordt gebruikt.

#### 1.6.4. Apparatuur

De GPC-apparatuur bestaat uit de volgende onderdelen :

- Oplosmiddelreservoir
- Ontgasser (indien van toepassing)
- Pomp
- Pulsdemper (indien van toepassing)
- Injectiesysteem
- Chromatografiekolommen
- Detector
- Stromingsmeter (indien van toepassing)
- Gegevensrecorder/verwerker
- Afvalreservoir.

Er moet voor worden gezorgd dat het GPC-systeem niet met de gebruikte oplosmiddelen reageert (bijvoorbeeld door stalen capillairen te gebruiken voor THF-oplossingen).

#### 1.6.5. Injectie- en oplosmiddeltoevoersysteem

Een bekend volume van de monsteroplossing wordt met behulp van een autosampler of manueel in een scherp begrensde zone op de kolom gebracht. Wanneer bij manueel opbrengen de plunjer van de injectiespuit te snel wordt ingedrukt of teruggetrokken, kan dit tot veranderingen in de waargenomen molecuulgewichtsverdeling leiden. Het oplosmiddeltoevoersysteem moet voorzover mogelijk pulsatievrij zijn en liefst een pulsdemper bevatten. De stroomsnelheid moet ongeveer 1 ml/min zijn.

#### 1.6.6. Kolom

Afhankelijk van het monster wordt het polymeer gekarakteriseerd met behulp van één kolom of een aantal in serie gekoppelde kolommen. In de handel zijn verschillende poreuze pakkingsmaterialen met bekende eigenschappen (bijvoorbeeld poriegrootte en exclusiegrens) verkrijgbaar. De keuze van de gel en de lengte van de kolom wordt bepaald door zowel de eigenschappen van het monster (hydrodynamisch volume, molecuulgewichtsverdeling) als de specifieke omstandigheden voor de scheiding zoals oplosmiddel, temperatuur en stroomsnelheid (1) (2) (3).



### 1.6.7. Theoretische schotels

De voor de scheiding gebruikte kolom of combinatie van kolommen moet worden gekarakteriseerd met behulp van het aantal theoretische schotels. Daartoe moet, indien THF als elutievlloeistof wordt gebruikt, een oplossing van ethylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof op een kolom met een bekende lengte worden gebracht. Het aantal theoretische schotels wordt berekend met de volgende vergelijking :

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{of} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

waarbij :

N = het aantal theoretische schotels;

$V_e$  = het elutievolume bij de top van de piek;

W = de piekbreedte aan de basis;

$W_{1/2}$  = de piekbreedte op halve hoogte.

### 1.6.8. Scheidend vermogen

Naast het aantal theoretische schotels, een grootheid die bepalend is voor de bandbreedte, speelt ook het scheidend vermogen, dat wordt bepaald door de helling van de kalibratiecurve, een rol. Het scheidend vermogen van een kolom kan als volgt worden bepaald :

$$\frac{V_{eM_x} - V_{e(10M_x)}}{\text{oppervlak doorsnede van de kolom}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

waarbij :

$V_{eM_x}$  = het elutievolume voor polystyreen met molecuulgewicht  $M_x$ ;

$V_{e(10 M_x)}$  = het elutievolume voor polystyreen met een tien keer zo hoog molecuulgewicht.

De resolutie van het systeem wordt meestal als volgt gedefinieerd :

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

waarbij :

$V_{e1}, V_{e2}$  = het elutievolume van de twee polystyreenstandaards bij de top van de piek;

$W_1, W_2$  = de piekbreedte aan de basis;

$M_1, M_2$  = het molecuulgewicht bij de top van de pieken (deze moeten een factor 10 van elkaar verschillen).

De R-waarde voor het kolomsysteem moet groter zijn dan 1,7 (4).

### 1.6.9. Oplosmiddelen

Alle oplosmiddelen moeten zeer zuiver zijn (THF wordt gebruikt met een zuiverheid van 99,5 %). Het oplosmiddelreservoir (indien nodig onder inert gas) moet groot genoeg zijn voor de kalibratie van de kolom en de analyse van verschillende monsters. Het oplosmiddel moet worden ontgast voordat het via de pomp naar de kolom wordt getransporteerd.

### 1.6.10. Temperatuurbewaking

De temperatuur van de kritische interne onderdelen (injectieblok, kolommen, detector en leidingen) moet constant zijn en in overeenstemming zijn met het gekozen oplosmiddel.

### 1.6.11. Detector

De detector is bedoeld om de concentratie van het monster in het eluaat uit de kolom kwantitatief te registreren. Om een onnodige verbreding van de pieken te voorkomen, moet het volume van de meetcel van de detector zo klein mogelijk worden gehouden. Het volume mag niet groter zijn dan 10  $\mu\text{l}$ , behalve voor lichtverstrooiings- en viscositeitsdetectoren. Meestal wordt voor de detectie differentiële refractometrie gebruikt. Indien dit in verband met de specifieke eigenschappen van het monster of de elutievlloeistof nodig is, kunnen echter ook andere soorten detectors worden gebruikt, zoals UV/VIS, IR of viscositeitsdetectoren.

## 2. GEGEVENS EN RAPPORTAGE

### 2.1. Gegevens

Voor de gedetailleerde beoordelingscriteria en voor de eisen ten aanzien van het verzamelen en bewerken van de gegevens wordt verwezen naar de DIN-norm (1).

Voor elk monster moeten twee onafhankelijke experimenten worden uitgevoerd die los van elkaar moeten worden geanalyseerd. Het is van essentieel belang dat in alle gevallen onder dezelfde omstandigheden als de bepaling bij het monster ook een blancobepaling wordt uitgevoerd.

Er moet expliciet worden vermeld dat de gemeten waarden relatief zijn en worden uitgedrukt in equivalent-molecuulgewicht van de gebruikte standaard.

Na de bepaling van de retentievolumes of de retentietijden (eventueel gecorrigeerd met behulp van een interne standaard) wordt de logaritmische waarde van  $M_p$  (waarbij  $M_p$  de top van de piek van de kalibratiestandaard is) tegen een van deze grootheden uitgezet. Per log-interval zijn minimaal twee kalibratiepunten nodig en voor de curve als geheel minimaal vijf meetpunten. Het geraamde molecuulgewicht van het monster moet tussen het eerste en het laatste meetpunt liggen. Voor de bepaling van het laagste molecuulgewicht van de kalibratiecurve wordt een oplossing van n-hexylbenzeen of een andere geschikte apolaire stof gebruikt. Het gedeelte van de curve dat overeenkomt met molecuulgewichten lager dan 1 000 wordt indien nodig gecorrigeerd voor verontreinigingen en additieven. De evaluatie van de elutiecurves gebeurt meestal met behulp van elektronische gegevensverwerking. Wanneer de digitalisering met de hand gebeurt, kan ASTM D 3536-91 (3) worden geraadpleegd.

Als er onoplosbaar polymeer op de kolom achterblijft, zal dit waarschijnlijk een hoger molecuulgewicht hebben dan de opgeloste fractie en als daar geen rekening mee wordt gehouden, zou het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen waarschijnlijk te hoog uitvallen. In de bijlage worden richtsnoeren gegeven om het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen te corrigeren voor de aanwezigheid van onoplosbaar polymeer.

De verdelingskromme moet in de vorm van een tabel of als figuur (al dan niet cumulatieve frequentieverdeling tegen log M) worden verstrekt. Bij de grafische weergave moet één log-interval van het molecuulgewicht normaal gesproken ongeveer 4 cm breed zijn en moet de top van de piek ongeveer 8 cm hoog zijn. Bij een cumulatieve frequentieverdeling moet het verschil op de y-as tussen 0 en 100 % ongeveer 10 cm zijn.

## 2.2. Testverslag

Het testverslag moet de volgende informatie bevatten :

### 2.2.1. Onderzochte stof

- Beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigingen).
- Beschrijving van de behandeling van het monster, opmerkingen, problemen.

### 2.2.2. Apparatuur

- Elutievloeistofreservoir, inert gas, ontgassing van de elutievloeistof, samenstelling van de elutievloeistof, verontreinigingen.
- Pomp, pulsdemper, injectiesysteem.
- Scheidingskolommen (fabrikant, alle informatie over de kenmerken van de kolommen zoals poriegrootte en aard van het pakkingsmateriaal, aantal, lengte en volgorde van de gebruikte kolommen).
- Aantal theoretische schotels van de kolom (of de combinatie), scheidend vermogen (resolutie van het systeem).
- Informatie over de symmetrie van de pieken.
- Kolomtemperatuur, aard van de temperatuurregeling.
- Detector (meetprincipe, type, volume van de meetcel).
- Stromingsmeter, indien gebruikt (fabrikant, meetprincipe).
- Systeem voor gegevensregistratie en -verwerking (hardware en software).

### 2.2.3. Kalibratie van het systeem

- Gedetailleerde beschrijving van de methode die wordt gebruikt om de kalibratiecurve samen te stellen.
- Informatie over de kwaliteitscriteria voor deze methode (bijvoorbeeld correlatiecoëfficiënt of som van de kwadraten).
- Informatie over alle extrapolaties, veronderstellingen en benaderingen tijdens de experimentele procedure en de beoordeling en verwerking van gegevens.
- Alle metingen die voor de samenstelling van de kalibratiecurve worden gebruikt, moeten in een tabel worden opgenomen waarbij voor elk kalibratiepunt de volgende informatie moet worden vermeld :
  - naam van het monster;
  - fabrikant van het monster;
  - normale waarden van  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$  en  $M_w/M_n$ , zoals deze door de fabrikant zijn verstrekt of door latere metingen zijn bepaald, alsmede gedetailleerde informatie over de bepalingmethode;
  - geïnjecteerd volume en concentratie daarin;
  - voor kalibratie gebruikte waarde van  $M_p$ ;
  - bij de top van de piek gemeten elutievolume of gecorrigeerde retentietijd;
  - bij de top van de piek berekende  $M_p$ ;
  - procentuele fout van berekende  $M_p$  en de kalibratiewaarde.

### 2.2.4. Informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen

- Beschrijving van de bij de analyse gebruikte methoden en de wijze waarop de experimenten zijn uitgevoerd.
- Informatie over het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster).
- Informatie over het gehalte aan verontreinigingen, additieven en andere niet-polymeerbestanddelen (als gewichtspercentage van het totale monster).

### 2.2.5. Evaluatie

- Evaluatie op basis van tijd : alle methoden die worden gebruikt om de vereiste reproduceerbaarheid te waarborgen (correctiemethode, interne standaard enz.).
- Informatie over de keuze voor elutievolume of retentietijd als basis voor de evaluatie.
- Informatie over de grenzen van de evaluatie als een piek niet volledig wordt geanalyseerd.
- Beschrijving van afvlakmethoden indien deze zijn gebruikt.
- Procedures voor de bereiding en voorbehandeling van het monster.
- Eventuele aanwezigheid van onopgeloste deeltjes.
- Geïnjecteerd volume ( $\mu\text{l}$ ) en concentratie daarin ( $\text{mg/ml}$ ).
- Bespreking van effecten die tot afwijkingen van het ideale GPC-profiel leiden.
- Gedetailleerde beschrijving van alle wijzigingen in de testprocedures.
- Gedetailleerde informatie over de foutintervallen.
- Alle andere informatie en opmerkingen die relevant zijn voor de interpretatie van de resultaten.

### 3. REFERENTIES

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

### Bijlage

#### Richtsnoren om het gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen te corrigeren voor de aanwezigheid van onoplosbaar polymeer

Wanneer een monster onoplosbaar polymeer bevat, gaat tijdens de GPC-analyse massa verloren. Het onoplosbare polymeer blijft irreversibel op de kolom of het monsterfilter achter, terwijl het oplosbare gedeelte van het monster door de kolom loopt. Wanneer de stijging van de brekingsindex ( $dn/dc$ ) van het polymeer kan worden geschat of gemeten, kan de massa van de hoeveelheid monster die op de kolom verloren is gegaan, worden geschat. In dat geval wordt de correctie bepaald met behulp van een externe kalibratie met standaardmaterialen met een bekende concentratie en  $dn/dc$  om de respons van de refractometer te kalibreren. In het hier gegeven voorbeeld wordt een PMM-standaard (polymethylmethacrylaat) gebruikt.

Bij de externe kalibratie voor de analyse van acrylpolymeren wordt een PMM-standaard met een bekende concentratie in tetrahydrofuraan met behulp van GPC geanalyseerd en worden de resultaten gebruikt voor de bepaling van de refractometerconstante volgens de volgende vergelijking :

$$K = R / (C \times V \times dn/dc)$$

waarbij

K = de refractometerconstante (in microvoltseconde/ml);

R = de respons van de PMM-standaard (in microvoltseconde);

C = de concentratie van de PMM-standaard (in  $\text{mg/ml}$ );

V = het geïnjecteerde volume (in ml);

$dn/dc$  = de stijging van de brekingsindex voor PMM in tetrahydrofuraan (in  $\text{ml/mg}$ ).

Normale waarden voor een PMM-standaard zijn :

R = 2 937 891;

C = 1,07  $\text{mg/ml}$ ;

V = 0,1 ml;

$dn/dc$  =  $9 \times 10^{-5}$   $\text{ml/mg}$ .

Met de aldus berekende waarde van K ( $3,05 \times 10^{11}$ ) wordt vervolgens de theoretische respons van de detector berekend als het geïnjecteerde polymeer voor 100 % via de detector zou zijn geëluëerd.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 4 februari 2000.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

## BIJLAGE III

## A.20. OPLOS/EXTRACTIEGEDRAG VAN POLYMEREN IN WATER

## 1. METHODE

De hier beschreven methode is overgenomen van de herziene versie van TG 120 van de OESO (1997). Voor nadere technische informatie wordt verwezen naar referentie (1).

## 1.1. Inleiding

Voor bepaalde polymeren (bijvoorbeeld emulsiopolymeren) moeten eerst voorbereidende werkzaamheden worden uitgevoerd voordat de hier beschreven methode kan worden toegepast. De methode kan niet worden gebruikt voor vloeibare polymeren en voor polymeren die onder de testomstandigheden met water reageren.

Wanneer de methode niet geschikt of niet bruikbaar is, kan het oplos/extractiegedrag met behulp van andere methoden worden onderzocht. In dat geval moet een gedetailleerde beschrijving van en een volledige motivering voor de gebruikte methode worden gegeven.

## 1.2. Referentiestoffen

Geen.

## 1.3. Principe van de testmethode

Het oplos/extractiegedrag van polymeren in waterig milieu wordt bepaald met behulp van de kolfmethode (zie methode A.6 : Oplosbaarheid in water, methode met de kolf) waarin onderstaande wijzigingen worden aangebracht.

## 1.4. Kwaliteitscriteria

Geen.

## 1.5. Beschrijving van de testmethode

## 1.5.1. Apparatuur

Voor deze methode is de volgende apparatuur nodig :

- een vergruizer, bijvoorbeeld een maalapparaat, om deeltjes met een bekende grootte te vervaardigen;
- een schudapparaat met regelbare temperatuur;
- een membraanfiltersysteem;
- adequate analyseapparatuur;
- gestandaardiseerde zeven.

## 1.5.2. Monstervoorbereiding

Een representatief monster moet eerst worden vergruisd tot deeltjes met een grootte van 0,125 tot 0,25 mm (gebruik hierbij geschikte zeven). Voor de stabiliteit van het monster of voor het maalprocédé kan koeling nodig zijn. Rubberachtige materialen kunnen bij de temperatuur van vloeibare stikstof worden vergruisd (1).

Als het niet mogelijk is een fractie met de vereiste deeltjesgrootte te verkrijgen, moet worden getracht de deeltjesgrootte zoveel mogelijk te verlagen en moet het resultaat in het verslag worden vermeld. Tevens moet in het verslag worden vermeld hoe het vergruisde monster voor de test is bewaard.

## 1.5.3. Procedure

In drie kolven met een glazenstop wordt telkens 10 g van de te onderzoeken stof afgewogen. Vervolgens wordt aan elke kolf 1 000 ml water toegevoegd. Indien het niet mogelijk blijkt met een hoeveelheid van 10 g polymeer te werken, moet de eerst hogere hoeveelheid worden gebruikt waarmee wel kan worden gewerkt en moet de hoeveelheid water dienovereenkomstig worden aangepast.

De kolven worden goed afgesloten en vervolgens bij 20°C geschud. Hiervoor wordt een schud- of roermachine gebruikt waarmee bij constante temperatuur kan worden gewerkt. Na 24 uur wordt de inhoud van elke kolf gecentrifugeerd of gefiltreerd en wordt de polymeerconcentratie in de heldere waterige fase met behulp van een geschikte analysemethode bepaald. Indien er geen geschikte analysemethoden voor de waterige fase beschikbaar zijn, kan de totale oplosbaarheid/extraheerbaarheid op basis van het drooggewicht van het residu op het filter of het gecentrifugeerde neerslag worden bepaald.

Meestal moet bij de kwantitatieve bepaling onderscheid worden gemaakt tussen de verontreinigingen en additieven enerzijds en het polymeer met een laag molecuulgewicht anderzijds. Bij een gravimetrische bepaling is het ook belangrijk dat er een blancobepaling zonder te onderzoeken stof wordt uitgevoerd om rekening te kunnen houden met residuen ten gevolge van de experimentele procedure.

Het oplos/extractiegedrag van polymeren in water bij 37°C bij pH 2 en pH 9 kan op dezelfde wijze worden bepaald zoals beschreven voor de uitvoering van het experiment bij 20°C. De pH kan worden aangepast door de toevoeging van geschikte bufferoplossingen of zuren of basen als zoutzuur, azijnzuur, natrium- of kaliumhydroxide (p.a.) of NH<sub>3</sub>.

Afhankelijk van de gebruikte analysemethode moet de test een- of tweemaal worden uitgevoerd. Wanneer voldoende specifieke methoden beschikbaar zijn voor een directe analyse van de polymeercomponent in de waterige fase, moet één in het voorgaande beschreven test voldoende zijn. Wanneer dergelijke methoden echter niet beschikbaar zijn en het oplos/extractiegedrag van de polymeer uitsluitend wordt bepaald via een indirecte analyse waarbij alleen het totale gehalte aan organische koolstof (TOC) van het waterig extract wordt bepaald, moet de test tweemaal worden uitgevoerd. Deze tweede test moet ook in triplo gebeuren met polymeermonsters die tien keer zo klein zijn als bij de eerste test en dezelfde hoeveelheden water.

## 1.5.4. Analyse

## 1.5.4.1. Met één monsterhoeveelheid uitgevoerde test

Het is mogelijk dat er methoden beschikbaar zijn voor een directe analyse van de polymeercomponent in de waterige fase. Als dit niet het geval is, kan worden overwogen een indirecte analyse van opgeloste/geëxtraheerde polymeercomponenten uit te voeren, waarbij het totale gehalte aan oplosbaar materiaal wordt bepaald en wordt gecorrigeerd voor componenten die niet polymeerspecifiek zijn.

Een analyse van de totale hoeveelheid polymeer in de waterige fase is mogelijk :

met behulp van een voldoende gevoelige methode zoals

— TOC met ontleding door persulfaat of dichromaat tot CO<sub>2</sub>, gevolgd door bepaling met behulp van IR of chemische analyse;

— atoomabsorptiespectrometrie (AAS) of emissiespectrometrie met inductief gekoppeld plasma (ICP) voor polymeren die silicium of metaal bevatten;

- UV-absorptie of spectrofluorimetrie voor arylpolymeren;
- LC/MS voor monsters met een laag molecuulgewicht;

door vacuümverdamming van het waterig extract en analyse van het droge residu met behulp van spectroscopie (bijvoorbeeld IR of UV) of AAS/ICP.

Als een analyse van de waterige fase als zodanig niet uitvoerbaar is, moet het waterig extract worden geëxtraheerd met een niet met water mengbaar organisch oplosmiddel, bijvoorbeeld een gechloreerde koolwaterstof. Vervolgens wordt het oplosmiddel verdampt en wordt het polymeergehalte van het residu volgens een van bovenstaande analysemethoden bepaald. Om de mate van oplossing/extractie van het polymeer zelf te bepalen, moeten componenten van dit residu waarvan wordt vastgesteld dat ze verontreinigen of additieven zijn, in mindering worden gebracht.

Wanneer betrekkelijk grote hoeveelheden van dergelijke materialen aanwezig zijn, kan het nodig zijn het residu met behulp van bijvoorbeeld HPLC of GC te analyseren om onderscheid te maken tussen de verontreinigen en het monomeer en van het monomeer afgeleide stoffen zodat het werkelijke gehalte aan laatstgenoemde stoffen kan worden bepaald.

In sommige gevallen kan het voldoende zijn het organische oplosmiddel te verdampen en het droge residu te wegen.

#### 1.5.4.2. Met twee verschillende monsterhoeveelheden uitgevoerde test

Alle waterige extracten worden op TOC geanalyseerd.

Bij het niet-opgeloste/niet-geëxtraheerde deel van het monster wordt een gravimetrische bepaling uitgevoerd. Als na centrifugeren of filteren van de inhoud van de kolf polymeerresten op de rand van de kolf zijn achtergebleven, moet de kolf met het filtraat worden gespoeld totdat alle zichtbare resten zijn verdwenen. Vervolgens wordt het filtraat opnieuw gecentrifugeerd of gefiltreerd. De op het filter of in de centrifugebuis achtergebleven residuen worden bij 40°C onder vacuüm gedroogd tot constant gewicht en vervolgens gewogen.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Met één monsterhoeveelheid uitgevoerde test

De aparte resultaten voor de drie kolven en de gemiddelde waarden moeten worden vermeld, uitgedrukt in massa-eenheden per volume oplossing (meestal mg/l) of massa-eenheden per massa polymeermonster (meestal mg/g). Daarnaast moet het gewichtsverlies van het monster worden vermeld (berekend als het gewicht van de opgeloste stof gedeeld door het gewicht van het oorspronkelijke monster). Bovendien moet de relatieve standaardafwijking worden berekend. Deze gegevens moeten worden vermeld voor de stof als geheel (polymeer + essentiële additieven enz.) en voor het zuivere polymeer (d.w.z. nadat de bijdrage van dergelijke additieven is afgetrokken).

### 2.2. Met twee verschillende monsterhoeveelheden uitgevoerde test

Voor elk waterig extract van de twee in triplo uitgevoerde experimenten dient de TOC-waarde te worden vermeld en daarnaast de gemiddelde waarde voor elk experiment. Deze gegevens dienen te worden uitgedrukt in massa-eenheden per volume oplossing (meestal mg C/l) en massa-eenheden per gewicht van het oorspronkelijke monster (meestal mg C/g).

Als er geen verschil is tussen de resultaten met de hoge en de lage monster/waterverhouding, kan dit erop wijzen dat alle extraheerbare componenten inderdaad zijn geëxtraheerd. In dat geval zou een directe analyse normaal gesproken niet nodig zijn.

Voor elk residu moet het gewicht worden vermeld en worden uitgedrukt als percentage van het oorspronkelijke gewicht van het monster. Per experiment dient het gemiddelde te worden berekend. Het percentage oplosbaar en extraheerbaar materiaal in het oorspronkelijke monster wordt berekend door het gevonden percentage van 100 % af te trekken.

## 3. RAPPORTAGE

### 3.1. Testverslag

In het testverslag moet de volgende informatie worden opgenomen.

#### 3.1.1. Onderzochte stof

— Beschikbare informatie over de onderzochte stof (identiteit, additieven, verontreinigen, gehalte aan laagmoleculaire bestanddelen).

#### 3.1.2. Testomstandigheden

- Beschrijving van de gevolgde procedures en de testomstandigheden.
- Beschrijving van de analyse- en detectiemethoden.

#### 3.1.3. Resultaten

— De oplosbaarheid/extraheerbaarheid in mg/l; aparte resultaten bij de verschillende oplossingen en gemiddelde waarden, gesplitst in polymeergehalte en verontreinigen, additieven enz.

— Oplosbaarheid/extraheerbaarheid in mg/g polymeer.

— TOC-waarden van de waterige extracten, gewicht van de opgeloste stof en berekende percentages, indien gemeten.

— De pH van elk monster.

— Informatie over de blancobepalingen.

— Indien nodig gegevens over de chemische instabiliteit van de onderzochte stof, zowel tijdens de testprocedure als tijdens de analyse.

— Alle informatie die voor de interpretatie van de resultaten van belang is.

## 4. REFERENTIE

(1) DIN 53733 (1976), Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 4 februari 2000.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

## BIJLAGE IV

## C.13. BIOCONCENTRATIE : DOORSTROOMTEST MET VISSEN

## 1. METHODE

Deze methode voor het meten van de bioconcentratie stemt overeen met OESO-methode TG 305 (1996).

## 1.1. Inleiding

Deze methode betreft een procedure voor de bepaling van het bioconcentratiegedrag van stoffen in vissen in een „flow-through“-situatie (doorstromend water). Hoewel een doorstroomtest veruit te verkiezen is, mag eventueel ook in semi-statische omstandigheden worden gewerkt voorzover aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De beschrijving van de methode omvat alle bijzonderheden die nodig zijn om de test te kunnen uitvoeren; er blijft voldoende ruimte om de proefopzet aan te passen aan de omstandigheden in het betrokken laboratorium en de specifieke karakteristieken van de teststof. De methode is bij uitstek geschikt voor stabiele organische verbindingen met een  $\log P_{ow}$ -waarde tussen 1,5 en 6,0 (1), maar mag niettemin ook worden toegepast op superlipofiele stoffen (met een  $\log P_{ow} > 6,0$ ). De voorlopige (a priori) schatting van de bioconcentratiefactor („BCF” of ook wel „ $K_B$ ”) zal voor dergelijke superlipofiele stoffen meestal hoger zijn dan de met behulp van laboratoriumexperimenten bepaalde bioconcentratiefactor in de stationaire situatie ( $BCF_{SS}$ ). Een preliminaire schatting van de bioconcentratiefactor van organische stoffen met een  $\log P_{ow}$ -waarde die 9,0 of minder bedraagt, kan worden verkregen door toepassing van de vergelijking van Bintein et al. (2). De parameters die het bioconcentratiegedrag karakteriseren, omvatten de opnamesnelheidsconstante ( $k_1$ ), de depuratiesnelheidsconstante ( $k_2$ ) en de  $BCF_{SS}$ .

Het gebruik van radioactief gemerkte teststoffen kan de analyse van de water- en vismonsters vergemakkelijken en laat ook toe te bepalen of het noodzakelijk is eventuele afbraakstoffen te identificeren en te kwantificeren. Indien de totale hoeveelheid radioactieve residu's wordt gemeten (bijvoorbeeld door verbranding of weefselsolubilisatie), heeft de gemeten BCF betrekking op de oorspronkelijke verbinding, de eventueel achterblijvende metabolieten daarvan en de geassimileerde koolstof. BCF-waarden die worden bepaald op basis van de totale hoeveelheid radioactieve residu's zijn derhalve niet zonder meer vergelijkbaar met BCF-waarden die worden verkregen door een specifieke chemische bepaling van (uitsluitend) de oorspronkelijke verbinding.

In studies met radioactieve merkers kan eventueel door toepassing van zuiveringstechnieken de BCF-waarde voor de oorspronkelijke verbinding worden bepaald; desgewenst kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd. Ook kan door analyse en identificatie van de residuen in de weefsels een studie van het metabolisme van de vissen met een bioconcentratieonderzoek worden gecombineerd.

## 1.2. Definities en eenheden

*Bioconcentratie/bioaccumulatie* is de toename van de concentratie van de teststof in of op een organisme (of bepaalde weefsels daarvan) ten opzichte van de concentratie van die stof in het omringende medium.

*De bioconcentratiefactor* (BCF of  $K_B$ ) op enig moment van de opnamefase van deze accumulatietest, is de verhouding van de concentratie van de teststof in of op de vis of bepaalde weefsels daarvan ( $C_f$  in  $\mu\text{g/g}$  (ppm)) en de concentratie van die stof in het omringende medium ( $C_w$  in  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)).

*De bioconcentratiefactor in stationaire situatie* ( $BCF_{SS}$  of  $K_B$ ) ondergaat gedurende langere tijd geen significante wijzigingen als de concentratie van de teststof in het omringende medium constant blijft.

*Een plateau (stationaire toestand)* wordt bereikt wanneer in een grafiek van de concentratie van de teststof in de vissen ( $C_f$ ) als functie van de tijd de curve evenwijdig gaat lopen met de tijd en drie opeenvolgende bepalingen van  $C_f$  op monsters die met tussenpozen van ten minste twee dagen worden genomen, niet meer dan 20 % van elkaar verschillen en er bovendien geen significant verschil bestaat tussen de waarden verkregen op de drie bemonsteringstijdstippen. Wanneer de analyse op samengevoegde monsters wordt uitgevoerd, zijn ten minste vier opeenvolgende bepalingen vereist. Voor teststoffen die langzaam worden opgenomen, verdient het de voorkeur om intervallen van zeven dagen te gebruiken.

*Een bioconcentratiefactor* die rechtstreeks uit de snelheidsconstanten ( $k_1/k_2$ ) wordt berekend, wordt kinetische bioconcentratiefactor ( $BCF_k$ ) genoemd.

*De octanol-water-partitiecoëfficiënt* ( $P_{ow}$  of  $K_{ow}$ ) is de verhouding van de oplosbaarheid van een stof in n-octanol en in water bij evenwicht (methode A.8). De logaritme van  $P_{ow}$  is een indicator van de neiging tot bioconcentratie van een chemische stof in aquatische organismen.

*De blootstellings- of opnamefase* is de periode gedurende welke de vissen aan de teststof worden blootgesteld.

*De opnamesnelheidsconstante* ( $k_1$ ) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in of op de proefdieren (of bepaalde weefsels daarvan) toeneemt wanneer de vissen aan die stof worden blootgesteld ( $k_1$  wordt uitgedrukt in  $\text{dag}^{-1}$ ).

*De op de blootstellingsfase volgende depuratiefase (eliminatiefase)* is de periode die begint op het moment dat de proefdieren van een medium dat de teststof bevat, worden overgebracht naar een medium dat die stof niet bevat, en gedurende welke de depuratie (of netto eliminatie) van de teststof uit de vis (of bepaalde weefsels daarvan) wordt bestudeerd.

*De depuratie- (of eliminatie-)snelheidsconstante* ( $k_2$ ) is het cijfer dat aangeeft hoe snel de concentratie van de teststof in het proefdier (of bepaalde weefsels daarvan) afneemt nadat de vis is overgebracht van een medium dat de teststof bevat naar een medium dat die stof niet bevat ( $k_2$  wordt uitgedrukt in  $\text{dag}^{-1}$ ).

## 1.3. Principe van de testmethode

De test omvat twee fasen : de blootstellingsfase (opnamefase) en de daaropvolgende depuratiefase. Gedurende de opnamefase worden afzonderlijke groepen vissen van dezelfde soort blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof. Met de overbrenging van de vissen naar een medium dat de teststof niet bevat, wordt de depuratiefase ingeluid. Een depuratiefase is altijd noodzakelijk, tenzij er zich tijdens de blootstellingsfase nauwelijks enige opname van de stof heeft voorgedaan (d.w.z. als de BCF minder dan 10 bedraagt). De concentratie van de teststof in of op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) wordt systematisch gedocumenteerd gedurende de beide fasen van de test. Naast de groepen vissen die aan de twee testconcentraties worden blootgesteld, wordt ook een controlegroep vissen gehouden onder - afgezien van de afwezigheid van de teststof - identieke omstandigheden. Op die manier kunnen de schadelijke effecten die eventueel in de bioconcentratietest worden waargenomen, worden gerelateerd aan waarnemingen op een passende controlegroep en kan een „nuleffectbepaling” van de concentraties van de teststof worden uitgevoerd.

De opnamefase duurt 28 dagen tenzij wordt aangetoond dat de evenwichtstoestand eerder wordt bereikt. Een raming van de duur van de opnamefase en de tijd die nodig is om de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) te bereiken, kan worden verkregen met behulp van de vergelijking in aanhangsel 3. Vervolgens wordt de depuratiefase aangevat : de vissen worden overgebracht naar een nieuwe, schone bak die hetzelfde medium, maar zonder de teststof, bevat. Zo mogelijk wordt de bioconcentratiefactor op twee manieren berekend : als bioconcentratiefactor in stationaire situatie ( $BCF_{ss}$ ), d.w.z. als de verhouding van de concentratie in de vissen ( $C_f$ ) en in het water ( $C_w$ ) bij kennelijk dynamisch evenwicht, en als kinetische bioconcentratiefactor ( $BCF_k$ ), d.w.z. als de verhouding van de snelheidsconstanten  $k_1$  (opname) en  $k_2$  (depuratie), uitgaande van een eersteordekinetiek. Als duidelijk is dat het proces niet door een eersteordekinetiek kan worden beschreven, moet een complexer model worden gebruikt (zie aanhangsel 5).

Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand (dynamisch evenwicht) is bereikt, dient de opnamefase te worden verlengd met 60 dagen, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; dan wordt de depuratiefase aangevat.

De opnamesnelheidsconstante, de depuratie- (eliminatie-)snelheidsconstante (of -constanten, indien een complexer model vereist is), de bioconcentratiefactor en, zo mogelijk, een betrouwbaarheidsinterval voor elk van deze parameters worden berekend aan de hand van het model dat de gemeten concentraties van de teststof in de vissen en het water het beste beschrijft.

De BCF wordt berekend aan de hand van het totale versgewicht van de vis. Voor bepaalde doeleinden mogen evenwel ook specifieke weefsels of organen (bijvoorbeeld spieren, lever) worden gebruikt als de vissen groot genoeg zijn of als zij kunnen worden opgedeeld in een eetbaar („filet”) en een niet-eetbaar („ingewanden”) gedeelte. Aangezien er voor veel organische stoffen een duidelijk verband bestaat tussen neiging tot bioconcentratie en lipofilie, bestaat er een overeenkomstig verband tussen het vetgehalte van de in de proeven gebruikte vissen en de waargenomen bioconcentratie van die stoffen. Om deze bron van variatie in de testresultaten voor stoffen met een goede oplosbaarheid in vetten (d.w.z. met  $\log P_{ow} > 3$ ) te verkleinen, dient de mate van bioconcentratie niet alleen te worden berekend op basis van de totale lichaamsmassa maar ook op basis van de vetfractie.

Het vetgehalte dient, voorzover mogelijk, te worden bepaald op hetzelfde biologisch materiaal waarop ook de concentratie van de teststof wordt bepaald.

#### 1.4. Gegevens betreffende de teststof

Alvorens met de bioconcentratietest wordt begonnen, moeten de volgende gegevens over de teststof bekend zijn :

- a) oplosbaarheid in water;
- b) octanol-water-partiticoëfficiënt (deze wordt met  $P_{ow}$  of ook wel met  $K_{ow}$  aangegeven en wordt bepaald met de HPLC-methode overeenkomstig A.8);
- c) hydrolyse;
- d) fotochemische omzetting in water onder invloed van natuurlijk of gesimuleerd zonlicht alsmede in de belichtingsomstandigheden waaronder ook de bioconcentratietest zal worden uitgevoerd (3);
- e) oppervlaktespanning (namelijk voor stoffen waarbij  $\log P_{ow}$  niet kan worden bepaald);
- f) dampspanning;
- g) biologische afbreekbaarheid (voorzover relevant).

Eveneens vereist zijn gegevens over de toxiciteit van de teststof voor de in de test gebruikte vissoort, bij voorkeur in de vorm van de asymptotische (tijdonaafhankelijke)  $LC_{50}$ . Er dient een passende analytische methode, met bekende nauwkeurigheid, precisie en gevoeligheid, voor de kwantitatieve bepaling van de teststof in de testoplossingen en in het biologisch materiaal beschikbaar te zijn, evenals een protocol voor de toebereiding en de opslag van de monsters. De analytische aantoonbaarheids grens van de teststof, zowel in water als in visweefsel, dient eveneens bekend te zijn. Wanneer een met  $^{14}C$  gemerkte teststof wordt gebruikt, moet bekend zijn welk percentage van de radioactiviteit met onzuiverheden is geassocieerd.

#### 1.5. Geldigheid van de test

Voor een valide test moet aan de volgende voorwaarden worden voldaan :

- de temperatuurschommelingen dienen kleiner te zijn dan  $\pm 2^\circ C$ ;
- de concentratie van de opgeloste zuurstof mag nooit minder bedragen dan 60 % van het verzadigingsniveau;
- de concentratie van de teststof in de bakken is gedurende de opnamefase nooit meer dan 20 % hoger of lager dan het gemiddelde van de gemeten waarden;
- de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren (ziekte) dienen aan het einde van de test zowel in de behandelde groep als in de controlegroep minder dan 10 % te bedragen; indien de test gedurende verscheidene weken of maanden wordt voortgezet, mogen de sterfte en de incidentie van andere ongunstige factoren in elk van beide groepen vissen niet meer bedragen dan 5 % per maand en 30 % in het totaal.

#### 1.6. Referentiestoffen

Het gebruik van referentiestoffen waarvan het bioconcentratiegedrag bekend is, kan in sommige gevallen nuttig zijn om de experimentele procedure te toetsen. Vooralsnog kunnen evenwel geen specifieke stoffen worden aanbevolen.

#### 1.7. Beschrijving van de testmethode

##### 1.7.1. Apparatuur

Voor alle onderdelen van de installatie moet het gebruik van materialen die oplossen of sorberen, waardoor stoffen in het water worden vrijgegeven of waardoor enig ander schadelijk effect op de vissen kan worden veroorzaakt, zoveel mogelijk worden vermeden. Er kunnen normale, uit een chemisch inert materiaal vervaardigde rechthoekige of cilindervormige bakken worden gebruikt die voldoende ruimte bieden, gegeven de beoogde populatiedichtheid (aantal vissen per liter water). Het gebruik van slangen uit zacht plastic moet zoveel mogelijk worden vermeden. Bij voorkeur dienen verbindingsbuizen van teflon (R), roestvrij staal en/of glas te worden gebruikt. De ervaring wijst uit dat het voor stoffen met een hoge adsorptiecoëfficiënt, zoals synthetische pyretroiden, noodzakelijk kan zijn gesilaniseerd glas te gebruiken. In een dergelijk geval moet de apparatuur na gebruik worden verwijderd (geen hergebruik).

##### 1.7.2. Water

Voor de test wordt normaliter water van natuurlijke oorsprong gebruikt dat wordt verkregen uit een niet-verontreinigde bron van uniforme kwaliteit. Het voor de verdunningen gebruikte water moet zodanig zijn dat de gekozen vissoort daarin gedurende de acclimatisatie en de looptijd van de test kan overleven zonder dat de specimens een abnormaal aspect of gedrag gaan vertonen. In het ideale geval wordt aangetoond dat de gekozen vissoort in het verdunningswater kan overleven, groeien en zich voortplanten (bijvoorbeeld in een laboratoriumkweek of in een toxiciteitstest die de hele levenscyclus omvat). Van het water moeten ten minste de pH, de hardheid, het totaalgehalte aan vaste stof en het totaalgehalte aan organische koolstof worden bepaald, alsmede, zo mogelijk, het ammonium- en

nitrietgehalte en de alkaliniteit en, voor mariene soorten, het zoutgehalte. De parameters die belangrijk zijn voor het optimale welzijn van de vissen zijn genoegzaam bekend; niettemin worden in aanhangsel 1 aanbevelingen gedaan wat betreft de maximumconcentratie van een aantal stoffen in het voor de tests gebruikte zoet en zeewater.

Het water dient gedurende de test een constante kwaliteit te vertonen. De pH-waarde dient in het interval 6,0-8,5 te liggen en mag bovendien in de loop van de test met niet meer dan  $\pm 0,5$  pH-eenheden schommelen. Om te garanderen dat het verdunningswater de testresultaten niet noemenswaardig beïnvloedt (bijvoorbeeld door complexatie van de teststof) en geen ongunstige invloed heeft op de conditie van de vissen, moeten regelmatig monsters worden genomen en geanalyseerd. Zware metalen (bijvoorbeeld Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de belangrijkste anionen en kationen (bijvoorbeeld Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ), bestrijdingsmiddelen (bijvoorbeeld totaalgehalte aan organofosfor-pesticiden en totaalgehalte aan organochloor-pesticiden) en het totaalgehalte aan organische koolstof en zwevende deeltjes moeten bijvoorbeeld om de drie maanden worden bepaald als van het verdunningswater bekend is dat het een relatief constante kwaliteit heeft. Indien is aangetoond dat de waterkwaliteit op een schaal van ten minste één jaar constant blijft, zijn minder frequente bepalingen en langere intervallen (bijvoorbeeld zes maanden) toelaatbaar.

Het natuurlijke gehalte aan zwevende deeltjes en het totaalgehalte aan organische koolstof (TOC) van het verdunningswater dienen zo laag mogelijk te zijn om te vermijden dat de teststof aan het organisch materiaal adsorbeert waardoor de biologische beschikbaarheid ervan zou afnemen (4). De maximale toelaatbare concentraties bedragen 5 mg/l voor deeltjes (droge stof, achterblijvend op een 0,45  $\mu\text{m}$  filter) en 2 mg/l voor het totaal aan organische koolstof (zie aanhangsel 1). Desnoods moet het water vóór gebruik worden gefilterd. De bijdrage van de proefdieren zelf (excrementen) en van de voedselresiduen aan de hoeveelheid organische koolstof in het water dient zo klein mogelijk te worden gehouden. Gedurende de hele duur van de test mag het gehalte aan organische koolstof in de proefbakken, afgezien van de koolstof in de teststof zelf en, in voorkomend geval, het agens dat de oplosbaarheid daarvan dient te verhogen, niet meer bedragen dan 10 mg/l  $\pm 20$  %).

### 1.7.3. Testoplossingen

Er wordt een stockoplossing met een passende concentratie van de teststof klaargemaakt. De stockoplossing wordt bij voorkeur bereid door eenvoudig mengen en schudden van de teststof in het verdunningswater. Het gebruik van oplosmiddelen of dispergeermiddelen (oplosbaarheidsbevorderende agentia) verdient geen aanbeveling; niettemin kan dit in bepaalde gevallen nodig zijn om een stockoplossing van een passende concentratie te verkrijgen. Als oplosmiddelen mogen ethanol, methanol, ethyleenglycol-monomethylether, ethyleenglycol-dimethylether, dimethylformamide en triëthyleenglycol worden gebruikt. Als dispergeermiddelen mogen Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcellulose en HCO-40 worden gebruikt. Wanneer biologisch gemakkelijk afbreekbare stoffen worden gebruikt, moet in het bijzonder worden gewaakt voor problemen die zich als gevolg van bacteriegroei in het doorstroomsysteem kunnen voordoen. De teststof mag radioactief worden gemerkt en dient de hoogste zuiverheidsgraad (bij voorkeur meer dan 98 %) te bezitten.

Voor doorstroomtests is een systeem vereist dat de stockoplossing van de teststof continu verdeelt en verdunt en ervoor zorgt dat in de bakken met de proefdieren de gewenste testconcentratie wordt gehandhaafd (bijvoorbeeld doseerpomp, mechanisme voor evenredige verdunning, saturatorsysteem). Een verversingssnelheid van ten minste vijf bakvolumes per dag voor iedere proefbak is wenselijk. Het gebruik van een doorstroomsysteem is verkieslijk, maar als dit niet mogelijk is (bijvoorbeeld omdat de gebruikte proefdieren daarvan schade ondervinden) mag een semi-statisch systeem worden gebruikt op voorwaarde dat aan de validiteitscriteria wordt voldaan. De stroomsnelheid van de stockoplossingen en het verdunningswater moet 48 uur vóór het begin van de test en vervolgens (gedurende de test) ten minste eenmaal per dag worden gecontroleerd. Deze controle omvat eveneens de bepaling van de stroomsnelheid door iedere proefbak afzonderlijk; er moet op worden toegezien dat de verschillen, zowel per bak als tussen de bakken onderling, niet meer dan 20 % bedragen.

### 1.7.4. Keuze van de vissoort

Belangrijke criteria bij de keuze van de soort zijn dat zij gemakkelijk verkrijgbaar is, dat exemplaren van de geschikte grootte beschikbaar zijn en dat de soort op een bevredigende manier in het laboratorium kan worden gehouden. Andere keuzecriteria zijn het recreatieve, commerciële of ecologische belang van de soort alsmede haar relatieve gevoeligheid, het succes waarmee zij in het verleden is gebruikt enz.

In aanhangsel 2 wordt een aantal aanbevolen soorten opgesomd. Ook ander soorten mogen worden gebruikt, maar in dat geval kan het nodig zijn de testprocedure aan te passen om geschikte proefomstandigheden te creëren. In dit geval moeten de redenen waarom de soort werd gekozen en de bijzonderheden van de proefopzet worden gerapporteerd.

### 1.7.5. Leefomstandigheden van de vissen

Laat het visbestand gedurende ten minste twee weken acclimatiseren in water dat de temperatuur heeft waarbij de test zal worden uitgevoerd; verschaft continu voldoende voedsel van hetzelfde type als datgene dat bij de test zal worden gebruikt.

Na een aanpassingsperiode van 48 uur wordt de sterfte geregistreerd en worden de volgende criteria toegepast :

- sterfte groter dan 10 % van de populatie in zeven dagen : de hele partij wordt afgekeurd;
- de sterfte bedraagt 5 tot 10 % van de populatie in zeven dagen : verdere acclimatisatie gedurende zeven dagen;
- de sterfte bedraagt minder dan 5 % van de populatie in zeven dagen : de partij wordt geaccepteerd, maar achteraf alsnog afgekeurd indien gedurende de volgende periode van zeven dagen meer dan 5 % sterfte optreedt.

Zie erop toe dat de voor de test gebruikte vissen geen zichtbare ziekte-tekens of abnormaliteiten vertonen. Verwijder alle zieke vissen. De vissen mogen niet tegen ziekten worden behandeld gedurende de test of gedurende de twee weken die daaraan voorafgaan.

## 1.8. Uitvoering van de test

### 1.8.1. Verkennende test

Het verdient aanbeveling een verkennende proef uit te voeren om de proefomstandigheden bij de definitieve test (bijvoorbeeld teststofconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase) te optimaliseren.

### 1.8.2. Blootstellingsomstandigheden

#### 1.8.2.1. Duur van de opnamefase

De duur van de opnamefase kan worden geschat op basis van bestaande praktijkervaring (bijvoorbeeld gegevens uit een eerdere studie of kennis van de accumulatiesnelheid van een verwante chemische stof) of op basis van bepaalde empirische relaties, stoelend op gegevens betreffende de oplosbaarheid in water of de octanol-water-partiticoëfficiënt van de teststof (zie aanhangsel 3).



De opnamefase dient 28 dagen te duren, tenzij kan worden aangetoond dat reeds eerder een evenwicht wordt bereikt. Indien de stationaire toestand (dynamisch evenwicht) na 28 dagen nog niet is bereikt, moet de opnamefase met 60 dagen worden verlengd, tenzij de stationaire toestand eerder wordt bereikt; gedurende de hele voortzetting van de opnamefase worden ook de metingen voortgezet.

#### 1.8.2.2. Duur van de depuratiefase

Een tijd die half zo lang is als de opnamefase is meestal voldoende voor een adequate reductie (bijvoorbeeld met 95 %) van de lichaamsconcentratie van de teststof (zie aanhangsel 3 voor een verklaring van deze raming). Indien de tijd die nodig is voor een vermindering met 95 % in de praktijk te lang is (bijvoorbeeld indien de depuratiefase dan meer dan twee keer zo lang als de normale duur van de opnamefase, dus meer dan 56 dagen, zou duren) mag een kortere periode worden gebruikt (bijvoorbeeld tot de concentratie van de teststof minder dan 10 % van de concentratie in de stationaire toestand bedraagt). Voor stoffen met een ingewikkelder opname- en depuratiepatroon dat kan worden beschreven met een ééncompartimentmodel dat een eersteordekinetiek vertoont, moet evenwel toch in een langere depuratiefase worden voorzien met het oog op de bepaling van de eliminatiesnelheidsconstanten. De duur van de depuratiefase kan in voorkomend geval overigens mee worden beperkt door de tijd dat de concentratie van de teststof in de vissen boven de analytische aantoonbaarheidsgrens blijft.

#### 1.8.2.3. Aantal proefdieren

Kies het aantal vissen per testconcentratie zo dat bij iedere bemonstering ten minste vier vissen per monster beschikbaar zijn. Indien een groter statistisch onderscheidingsvermogen is vereist, dienen meer vissen per monster te worden gebruikt.

Als volwassen vissen worden gebruikt, moet worden gerapporteerd of mannelijke of vrouwelijke exemplaren, dan wel beide, werden gebruikt. In dit laatste geval moet voor het begin van de blootstelling worden aangetoond dat er tussen beide geslachten qua vetgehalte geen significant verschil bestaat. Het kan noodzakelijk zijn alle mannelijke en alle vrouwelijke exemplaren samen te voegen.

Voor elke test moeten vissen met een min of meer uniform lichaamsgewicht worden gebruikt: het gewicht van de kleinste vis mag niet minder bedragen dan twee derde van dat van de grootste. Alle vissen moeten tot dezelfde jaarklasse behoren en dezelfde oorsprong hebben. Aangezien het gewicht en de leeftijd van een vis soms een significant effect op de BCF lijken te hebben (1), moeten deze gegevens nauwkeurig worden geregistreerd. Het verdient aanbeveling vóór de test een steekproef uit het vissenbestand te wegen om een schatting van het gemiddelde gewicht te verkrijgen.

#### 1.8.2.4. Aantal vissen per liter

Gebruik een grote water/visverhouding om de vermindering van  $C_w$  door de introductie van de vissen bij het begin van de test zo klein mogelijk te houden en een afname van het gehalte aan opgeloste zuurstof te vermijden. Van belang is ook dat de dichtheid van de vissen op de biologische kenmerken van de gekozen soort wordt afgestemd. De aanbevolen dichtheid bedraagt normaliter 0,1-1,0 gram vis (versgewicht) per liter water per dag. Een grotere dichtheid is toelaatbaar als wordt aangetoond dat de schommelingen van de concentratie van de teststof de  $\pm 20$  %-grenzen niet overschrijden en het gehalte aan opgeloste zuurstof nooit minder bedraagt dan 60 % van het verzadigingspunt.

Bij de keuze van de geschikte vissendichtheid dient rekening te worden gehouden met de normale biotoop van de betrokken vissoort. Zo kunnen demersale vissen bij eenzelfde watervolume in het aquarium een grotere bodemopervlakte verlangen dan pelagische soorten.

#### 1.8.2.5. Voeding

Gedurende de acclimatisatie- en de testperiode wordt de vissen geschikt voer met een bekend vet- en totaal eiwitgehalte verstrekt in een voldoende hoeveelheid om ze gezond te houden en hun lichaamsgewicht op peil te houden. De vissen krijgen gedurende de acclimatisatie- en de testperiode dagelijks ongeveer 1 à 2 % van hun lichaamsgewicht te eten; bij een dergelijk regime blijft het vetgehalte bij de meeste vissoorten min of meer constant gedurende de test. De hoeveelheid voer moet bijvoorbeeld eens per week worden herberekend teneinde het lichaamsgewicht en het vetgehalte constant te houden. Voor die berekening kan het gewicht van de in iedere testbak overblijvende vissen worden geschat aan de hand van het gewicht van de vissen in de laatste uit die testbak getrokken steekproef. Het gewicht van de achterblijvende vissen zelf wordt niet bepaald.

Niet opgegeten voer en uitwerpselen worden dagelijks, korte tijd (30 minuten tot 1 uur) na de voeding, met behulp van een hevel uit de testbakken verwijderd. Die bakken worden in de loop van de test zo schoon mogelijk gehouden om de concentratie van organische stoffen zo laag mogelijk te houden, aangezien de aanwezigheid van organische koolstof de biologische beschikbaarheid van de teststof negatief kan beïnvloeden (1).

Aangezien vele visvoerders uit vismeel worden vervaardigd, moet het voeder op de aanwezigheid van de teststof worden onderzocht. Het verdient ook aanbeveling het voeder op de aanwezigheid van bestrijdingsmiddelen en zware metalen te onderzoeken.

#### 1.8.2.6. Licht en temperatuur

De belichtingsperiode belooft meestal 12 à 16 uur en de temperatuur  $\pm 2^\circ\text{C}$  dient geschikt te zijn voor de gebruikte vissoort (zie aanhangsel 2). Het type belichting en de karakteristieken daarvan dienen bekend te zijn. Er dient rekening te worden gehouden met de mogelijkheid dat de teststof bij de gebruikte belichting fotochemisch in andere stoffen wordt omgezet. Door een passende belichting moet worden vermeden dat de vissen aan onnatuurlijke fotochemische omzettingen worden blootgesteld. In bepaalde gevallen kan het nodig zijn de UV-straling met een golftegenstand van minder dan 290 nm weg te filteren.

#### 1.8.2.7. Testconcentraties

Er worden vissen blootgesteld aan ten minste twee concentraties van de teststof in doorstromend water. Normaliter wordt de hoogste concentratie van teststof zo gekozen dat zij ongeveer 1 % bedraagt van de acute asymptotische  $LC_{50}$  en ten minste tien keer zo hoog is als de aantoonbaarheidsgrens van de stof in water voor de gebruikte analysemethode.

De hoogste testconcentratie kan ook worden bepaald door de acute 96h- $LC_{50}$  te delen door een passende omzettingcoëfficiënt (de verhouding tussen de acuut letale en de chronisch letale concentratie, die voor diverse chemische stoffen kan variëren tussen ongeveer 3 en 100). Kies zo mogelijk de andere concentratie(s) zo dat zij een factor tien van elkaar verschillen. Indien dit in het licht van de andere criteria („1 % van  $LC_{50}$ ” en „boven de analytische aantoonbaarheidsgrens”) niet mogelijk is, kan een kleinere meetkundige reden worden gekozen of kan het gebruik van een met  $^{14}\text{C}$  gemerkte teststof worden overwogen. Gebruik geen concentraties die hoger zijn dan die van de verzadigde oplossing.

Wanneer een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, mag de concentratie daarvan niet meer bedragen dan 0,1 ml per liter en dient deze dezelfde te zijn in alle testbakken. De bijdrage van agens en teststof samen aan het totale organischekoolstofgehalte in het water in de testbakken moet bekend zijn. Het gebruik van dergelijke agentia moet hoe dan ook tot elke prijs worden vermeden.

#### 1.8.2.8. Controles

Naast de experimentele reeksen dient een controlegroep te worden behandeld met het verdunningswater of, in voorkomend geval, met dat water en het oplosbaarheidsbevorderend agens, voorzover vaststaat dat dat agens geen effect heeft op de vissen. Zoniet zijn beide controlebehandelingen noodzakelijk.

#### 1.8.3. Frequentie van de metingen van de waterkwaliteit

In de loop van de test moeten het gehalte aan opgeloste zuurstof, TOC, pH en temperatuur in alle bakken worden gemeten. De totale hardheid en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten worden gemeten in de bakken met de controlegroepen en in een bak met de hoogste teststofconcentratie. De zuurstofconcentratie en, voorzover relevant, het zoutgehalte moeten ten minste drie keer worden gemeten tijdens de opnamefase - aan het begin, omstreeks het midden en aan het einde van die fase - en vervolgens om de week gedurende de depuratiefase. De TOC moet worden bepaald bij het begin van de opnamefase (24 uur en 48 uur vóór de vissen in de bakken worden geïntroduceerd) en vervolgens ten minste wekelijks, zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. De temperatuur moet dagelijks worden gemeten, de pH aan het begin en aan het einde van elke periode en de hardheid eenmaal in de loop van de test. Het is wenselijk de temperatuur in ten minste één bak continu te registreren.

#### 1.8.4. Bemonstering en analyse van de vissen en het water

##### 1.8.4.1. Bemonsteringsschema voor vissen en water

Met het oog op de bepaling van de teststofconcentratie wordt het water in de testbakken bemonsterd vóór de vissen worden geïntroduceerd en voorts zowel gedurende de opname- als gedurende de depuratiefase. Het water moet ten minste even vaak als en tegelijk met de vissen worden bemonsterd, en wel vóór de voeding. Gedurende de opnamefase wordt de concentratie van de teststof bepaald om te controleren of aan de validiteitscriteria wordt voldaan.

De vissen worden ten minste vijfmaal in de loop van de opnamefase en ten minste viermaal in de loop van de depuratiefase bemonsterd. Omdat het in bepaalde gevallen moeilijk is op basis van dit aantal monsters een voldoende precieze schatting van de BCF-waarde te berekenen, met name wanneer er aanwijzingen bestaan dat een andere dan een simpele eersteorderdepuratiekinetiek wordt gevolgd, is het raadzaam gedurende beide periodes een hogere bemonsteringsfrequentie aan te houden (zie aanhangsel 4). De extra monsters worden bewaard en worden slechts geanalyseerd indien de resultaten van de eerste reeks analyses niet blijken te volstaan om de BCF met de gewenste precisie te berekenen.

Aanhangsel 4 bevat een voorbeeld van een goed bemonsteringsschema. Uitgaande van andere hypothetische  $P_{ow}$ -waarden ter bepaling van de blootstellingstijd die nodig is voor 95 % opname, kunnen probleemloos andere bemonsteringsschema's worden doorgerekend.

De bemonstering wordt tijdens de opnamefase voortgezet. Die fase duurt 28 dagen, tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Indien na 28 dagen nog geen stationaire toestand is bereikt, wordt de bemonstering gedurende 60 dagen voortgezet tenzij zich eerder een stationaire toestand instelt. Voor de start van de depuratiefase worden de vissen naar schone bakken overgebracht.

##### 1.8.4.2. Monsterneming en toebereiding van de monsters

De te analyseren watermonsters worden bijvoorbeeld verkregen door afheveling uit het midden van de testbak met behulp van een slang uit inert materiaal. Aangezien kennelijk noch filtratie, noch centrifugatie in alle omstandigheden een volledige scheiding van de biologisch beschikbare en de biologisch niet-beschikbare fractie van de teststof garanderen (met name niet voor superlipofiele stoffen, d.w.z. stoffen met een  $\log P_{ow} > 5$ ) (1) (5), dienen deze bewerkingen niet op de monsters te worden toegepast.

In plaats daarvan moeten maatregelen worden getroffen om de bakken zo schoon mogelijk te houden en moet het TOC-gehalte zowel gedurende de opnamefase als gedurende de depuratiefase bestendig worden gecontroleerd.

Bij iedere bemonstering wordt een adequaat aantal vissen (meestal ten minste vier) uit de testbakken verwijderd, kortstondig met water gespoeld, door afbetten „gedroogd”, onverwijd op de meest geschikte en humane manier gedood en gewogen.

Het verdient de voorkeur de vissen en het water onmiddellijk na de monsterneming te analyseren om afbraakprocessen en andere verliezen te vermijden. Bovendien kunnen op deze wijze naargelang de test vordert een benaderde opname- en depuratiesnelheid worden berekend. Indien de analyse meteen wordt uitgevoerd, wordt ook vermeden dat te veel tijd voorbijgaat alvorens het bereiken van het plateau wordt geconstateerd.

Indien de analyse niet onmiddellijk wordt uitgevoerd, worden de monsters in geschikte omstandigheden opgeslagen. In dit geval moeten, vooraleer de studie wordt aangevat, gegevens worden vergaard over de geschikte wijze van bewaring voor de teststof in kwestie - bijvoorbeeld diepvriezen of bewaren bij 4°C, duur van de opslag, wijze van extractie enz.

##### 1.8.4.3. Kwaliteit van de analysemethode

Aangezien de nauwkeurigheid, de precisie en de gevoeligheid van de analysemethode ten aanzien van de teststof bepalend zijn voor de kwaliteit van de hele procedure, moet experimenteel worden gecontroleerd of de precisie en de reproduceerbaarheid van de chemische analyse alsmede de terugvinding van de teststof in de water- en vismonsters bevredigend zijn voor de gekozen methode. Vergewis u eveneens van het feit dat geen teststof aantoonbaar is in het verdunningswater.

Zo nodig worden bij de test gemeten  $C_w$ - en  $C_f$ -waarden gecorrigeerd aan de hand van de terugvinding en de nuleffectmetingen bij de controlegroep(en). De vis- en watermonsters worden consequent behandeld op zodanige wijze dat contaminatie en verliezen (bijvoorbeeld als gevolg aan adsorptie aan de bemonsteringsapparatuur) zoveel mogelijk wordt vermeden.

#### 1.8.4.4. Analyse van de vismonsters

Indien in de test radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, kan hetzij de totale hoeveelheid radioactiviteit (d.w.z. in de oorspronkelijke stof én de metabolieten daarvan) worden gedoseerd, hetzij een zuivering worden uitgevoerd waardoor de oorspronkelijke stof afzonderlijk kan worden geanalyseerd. Ook kunnen de belangrijkste metabolieten worden gekarakteriseerd wanneer de stationaire toestand is bereikt c.q. aan het einde van de opnamefase (al naar gelang van wat zich het eerst voordoet). Indien de BCF, gemeten op basis van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen,  $\geq 1000$  % is, is het raadzaam - en voor bepaalde categorieën chemische stoffen zoals bestrijdingsmiddelen ten stelligste aan te bevelen - de afbraakproducten die in de stationaire toestand  $\geq 10$  % van de totale hoeveelheid residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, te identificeren en te kwantificeren. Indien de afbraakproducten die 10 % of meer van de totale hoeveelheid radioactief gemerkte residuen in het visweefsel vertegenwoordigen, worden geïdentificeerd en gekwantificeerd, verdient het aanbeveling de afbraakproducten in de geanalyseerde watermonsters op dezelfde wijze uit te splitsen.

De concentratie van de teststof dient normaliter voor iedere gewogen vis afzonderlijk te worden bepaald. Als zulks niet mogelijk is, mogen de gelijktijdig genomen vismonsters worden samengevoegd, maar een dergelijke samenvoeging houdt restricties in voor de statistische procedures die op de gegevens kunnen worden toegepast. Indien het belangrijk is dat een specifieke statistische procedure kan worden toegepast of een bepaald statistisch onderscheidingsvermogen wordt gehaald, moet de test, rekening houdend met die samenvoegingsprocedure en dat onderscheidingsvermogen, met een adequaat aantal proefdieren worden uitgevoerd (6) (7).

De BCF moet worden berekend in relatie tot het totale versgewicht en, voor zeer lipofiele stoffen, ook in relatie tot de vetfractie. Het vetgehalte van de vissen wordt zo mogelijk bij iedere bemonstering bepaald. Voor de bepaling van het vetgehalte moeten passende methoden worden gebruikt (zie de referenties 8 en 2 van aanhangsel 3). De chloroform/methanol-extractietechniek kan als standaardmethode worden aanbevolen (9). De verschillende methoden geven verschillende resultaten (10); Derhalve is het van belang dat bijzonderheden over de gebruikte methode worden verstrekt. De bepaling van het vet moet, als het kan, worden uitgevoerd op hetzelfde extract als datgene dat voor de bepaling van de teststof wordt gebruikt - de vetten moeten immers meestal toch worden verwijderd alvorens het extract chromatografisch kan worden geanalyseerd. Het vetgehalte van de vissen (in mg per kg versgewicht) behoort aan het einde van het experiment niet meer dan 25 % meer of minder te bedragen dan bij het begin. Het drogestofgehalte van het weefsel (in %) moet ook worden gerapporteerd met het oog op een mogelijke omrekening van het vetgehalte in termen van vers- respectievelijk drooggewicht.

## 2. GEGEVENS

### 2.1. Verwerking van de resultaten

De opnamecurve van de teststof wordt verkregen door de concentratie in/op de vissen (of bepaalde weefsels daarvan) in de opnamefase uit te zetten tegen de tijd in een lineair coördinatenstelsel. Als de curve een plateau bereikt, d.w.z. asymptotisch evenwijdig gaat lopen met de tijd, wordt  $BCF_{SS}$  berekend als :

$$\frac{C_t \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}{C_w \text{ in stationaire toestand (gemiddeld)}}$$

Als geen stationaire situatie wordt bereikt, kan niettemin  $BCF_{SS}$  met een voor de risico-evaluatie afdoende precisie worden berekend uit een benaderde „stationaire toestand” bij 80 % ( $1,6/k_2$ ) of 95 % ( $3,0/k_2$ ) van de evenwichtswaarde.

De kinetische concentratiefactor  $BCF_k$  wordt berekend als de verhouding  $k_1/k_2$  van de twee eersteordesnelheidsconstanten. De depuratiesnelheidsconstante ( $k_2$ ) wordt meestal bepaald op de depuratiecurve, dit is de grafiek van de afname van de teststofconcentratie in de vissen in de loop van de tijd. De opnamesnelheidsconstante ( $k_1$ ) wordt dan berekend uit  $k_2$  en een waarde voor  $C_t$  die wordt gehaald uit de opnamecurve (zie ook aanhangsel 5). Het verdient de voorkeur  $BCF_k$  en de snelheidsconstanten  $k_1$  en  $k_2$  te berekenen met behulp van een gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechniek (11). Is dit onmogelijk, dan kunnen  $k_1$  en  $k_2$  grafisch worden bepaald. Indien de depuratiecurve duidelijk geen eersteordekinetiek vertoont, moeten complexere modellen worden gebruikt (zie de referenties in aanhangsel 3) en moet het advies van een biostatisticus worden ingewonnen.

### 2.2. Interpretatie van de resultaten

De resultaten moeten met de nodige omzichtigheid worden geïnterpreteerd als de gemeten concentraties van de teststofoplossingen in de buurt liggen van de analytische aantoonbaarheidsgrens.

Bioconcentratiegegevens van goede kwaliteit resulteren in scherp afgetekende opname- en eliminatiecurven. Het verschil tussen de waarden voor de opname- respectievelijk de depuratieconstante als bepaald voor de twee testconcentraties behoort niet meer te bedragen dan 20 %. Indien tussen de gemeten waarden van de opname- c.q. de depuratiesnelheidsconstante voor de twee gebruikte testconcentraties een significant verschil bestaat, moet dit worden genoteerd en moeten mogelijk verklaringen worden gesuggereerd. Bij goed opgezette studies is het betrouwbaarheidsinterval voor de BCF in het algemeen niet veel ruimer dan (puntschatting)  $\pm 20$  %.

## 3. RAPPORTAGE

In het verslag over de test moeten de volgende gegevens worden opgenomen :

### 3.1. Teststof :

- voorkomen en, indien relevant, fysisch-chemische eigenschappen;
- chemische karakteristieken (eventueel met inbegrip van het organischekoolstofgehalte);
- indien radioactief gemerkt materiaal wordt gebruikt, de precieze positie van het radioactieve atoom (de radioactieve atomen) en het percentage van de radioactiviteit dat met onzuiverheden is geassocieerd.

### 3.2. Proefdiersoort :

- wetenschappelijke naam, stam, oorsprong, eventuele voorafgaande behandeling, acclimatisatie, leeftijd, grootte-interval enz.

### 3.3. Proefomstandigheden :

- gebruikte testprocedure (bijvoorbeeld doorstroomsysteem of semi-statisch systeem);
- aard en kenmerken van de gebruikte verlichting en lichtregime (L :D);

— proefopzet (bijvoorbeeld aantal en grootte van de testbakken, verversingssnelheid van het water, aantal replicaties, aantal vissen per replicatie, aantal testconcentraties, duur van de opname- en de depuratiefase, frequentie van de bemonstering van vissen en water);

— wijze waarop de stockoplossingen worden bereid en vervangingsfrequentie (indien een oplosbaarheidsbevorderend agens wordt gebruikt, moeten de aard, de concentratie en de bijdrage daarvan tot het organischekoolstofgehalte van het water in de testbakken worden vermeld);

— de nominale testconcentraties, de gemiddelden en standaardafwijkingen van de desbetreffende in de testbakken gemeten waarden en de methode waarmee zij zijn bepaald;

— de oorsprong van het verdunningswater, een beschrijving van de eventuele voorafgaande behandeling daarvan, de resultaten van eventuele proeven betreffende het vermogen van de proefdieren om in dat water te overleven en de kenmerken van dat water : pH, hardheid, temperatuur, gehalte aan opgeloste zuurstof, residueel chloorgehalte (indien bepaald), totale hoeveelheid organische koolstof (TOC) en zwevende deeltjes, zoutgehalte van het proefmedium (voorzover relevant), alsmede de resultaten van eventuele andere bepalingen;

— waterkwaliteit in de testbakken, pH, hardheid, TOC, temperatuur en gehalte aan opgeloste zuurstof;

— nadere gegevens over het voer (bijvoorbeeld aard, herkomst, samenstelling - zo mogelijk ten minste het vet- en het eiwitgehalte -, voederfrequentie en -hoeveelheid);

— gegevens over de behandeling van de vis- en watermonsters, met inbegrip van bijzonderheden over de voorbereiding, de opslag, de extractie en de procedures (met inbegrip van de precisie daarvan) voor de analytische bepaling van de teststof en, in voorkomend geval, het vetgehalte.

#### 3.4. Resultaten :

— resultaten van eventuele voorbereidende experimenten;

— sterfte van de vissen in de controlegroep(en) en de vissen in iedere proefbak, alsmede eventuele waarnemingen van abnormaal gedrag;

— het vetgehalte van de vissen (indien dit ter gelegenheid van de bemonstering werd bepaald);

— grafieken van het verloop van de opname (inclusief het bereiken van de stationaire toestand) en de depuratie van de teststof door de vissen (met een weergave van alle meetwaarden);

—  $C_f$  en  $C_w$  (met standaardafwijking en, desgewenst, bereik) voor ieder bemonsteringstijdstip.  $C_f$  wordt uitgedrukt in  $\mu\text{g}$  per gram versgewicht (ppm) van het lichaam als geheel of van bepaalde weefsels, bijvoorbeeld het vetweefsel, en  $C_w$  in  $\mu\text{g}$  per ml (ppm). De  $C_w$ -waarden voor de controlegroepen en de nuleffectmetingen dienen eveneens te worden gerapporteerd;

— de bioconcentratiefactor in stationaire situatie ( $BCF_{ss}$ ) en/of de kinetische bioconcentratiefactor ( $BCF_k$ ) alsmede, in voorkomend geval, de 95 %-betrouwbaarheidsgrenzen voor de opname- en de depuratie-(eliminatie-)snelheidsconstante, alle berekend in relatie tot het totale lichaamsgewicht c.q. de totale vetfractie (in voorkomend geval) van het dier of van nader omschreven weefsels. Voor iedere beproefde concentratie van de teststof moeten de gemiddelden, betrouwbaarheidsintervallen en standaardafwijkingen (voorzover bekend) worden gerapporteerd. Geef aan welke gegevensverwerkings- en rekenmethoden werden gebruikt;

— indien radioactief gemerkt materiaal werd gebruikt en voorzover daartoe aanleiding bestaat : gegevens over de eventuele accumulatie van metabolieten;

— alle ongewone verschijnselen die zich in de loop van de test hebben voorgedaan, alle afwijkingen van voornoemde procedures en alle andere relevante gegevens.

Aangezien metingen die resulteren in de conclusie „niet aantoonbaar bij de gegeven aantoonbaarheidsgrens” onbruikbaar zijn voor het berekenen van de snelheidsconstanten, moet door aanpassingen van de proefopzet in het licht van de gegevens van voorbereidende experimenten dat type uitkomst zoveel mogelijk worden vermeden.

#### 4. REFERENTIES

(1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp 117-156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, 29-390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. *Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals*. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish : Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. *Water Quality Institute*, Denmark.

(5) US EPA 822-R-94-002 (1994). Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(1). Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in « The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment : degradation, toxicity, bioaccumulation », Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.

(9) Gardner et al. (1995). *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099-1105.

(10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Chem.* 10, pp 1431-1436.

(11) CEC. Bioconcentration of chemical substances in fish : the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors : P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

## Aanhangsel 1

## Chemische karakteristieken van aanvaardbaar verdunningswater

	Stof	Drempelconcentratie
1	Deeltjes	5 mg/l
2	Totaal organische koolstof	2 mg/l
3	Niet-geïoniseerde ammoniak	1 µg/l
4	Residueel chloor	10 µg/l
5	Totaal organofosforpesticiden	50 ng/l
6	Totaal organochloorpesticiden plus polychloorbifenylen	50 ng/l
7	Totaal organische chloorverbindingen	25 ng/l
8	Aluminium	1 µg/l
9	Arseen	1 µg/l
10	Chroom	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Koper	1 µg/l
13	IJzer	1 µg/l
14	Lood	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Zink	1 µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Kwik	100 ng/l
19	Zilver	100 ng/l

## Aanhangsel 2

## Voor de tests geschikte vissoorten

	Aanbevolen soort	Aanbevolen temperatuurbereik (°C)	Aanbevolen grootte-klasse (totale lichaamslengte in cm)
1	Danio rerio (1) (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Zebravis	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) „Fathead minnow“	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karper	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) Japans rijstvisje	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) Guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) „Blue-gill“ - Zonnebaars	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Regenboogforel	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Driedoornige stekelbaars	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993), Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

In diverse landen zijn ook verschillende estuariene en mariene soorten gebruikt, bijvoorbeeld

Leiostomus xanthurus	(Puntombervis)
Cyprinodon variegatus	(Edelsteentandkarper)
Menidia beryllina	(„Silverside“)
Cymatogaster aggregata	(„Shiner perch“)
Parophrys vetulus	(„English sole“)
Leptocottus armatus	(„Staghorn sculpin“)
Gasterosteus aculeatus	(Driedoornige stekelbaars)
Dicentrarchus labrax	(Zeebaars)
Alburnus alburnus	(Alver).

#### Herkomst

De in de tabel genoemde zoetwatervissen zijn gemakkelijk te kweken en/of het hele jaar door vlot verkrijgbaar; de beschikbaarheid van de mariene en estuariene soorten verschilt van land tot land. De genoemde soorten kunnen in viskwekerijen of in het laboratorium vrij van ziekten en parasieten worden opgekweekt en tot voortplanting gebracht, zodat voor de test gezonde dieren van bekende afstamming kunnen worden gebruikt. Dergelijke vissen zijn in vele delen van de wereld verkrijgbaar.

#### Aanhangsel 3

##### Voorspelling van de duur van de opname- en de depuratiefase

###### 1. Voorspelling van de duur van de opnamefase

Alvorens de test wordt uitgevoerd, kan een schatting van  $k_2$  en derhalve van de tijd die nodig is om de stationaire toestand te bereiken, worden verkregen uit het empirische verband dat is aangetoond tussen  $k_2$  en de n-octanol-water-partiticoëfficiënt ( $P_{ow}$ ) en tussen  $k_2$  en de oplosbaarheid in water (s).

Een schatting van  $k_2$  ( $\text{dag}^{-1}$ ) kan bijvoorbeeld worden verkregen uit het volgende empirische verband (1) :

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

Voor andere verbanden, zie referentie (2).

Indien de waarde van de partiticoëfficiënt ( $P_{ow}$ ) niet bekend is, kan een schatting worden verkregen (3) uit de oplosbaarheid van de stof in water (s), aan de hand van :

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

waarin s = oplosbaarheid (mol/l) : (n = 36).

Deze verbanden zijn alleen geldig voor stoffen waarvoor de waarde van  $\log P_{ow}$  ligt tussen 2 en 6,5 (4).

De tijd die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken, kan worden geraamd met behulp van de schatting van  $k_2$  en de algemene vergelijking die de opname- en depuratiekinetiek beschrijft (eerstordekinetiek) :

$$\frac{dC_i}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_i$$

of, indien C constant is :

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

Bij het naderen van de stationaire toestand ( $t \rightarrow \infty$ ), kan vergelijking 3 worden vereenvoudigd (5) (6) tot :

$$C_i = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{of} \quad C_i/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}.$$

De grootte ( $k_1/k_2$ ).  $C_w$  is dan een benadering van de concentratie van de stof in de vissen in de stationaire toestand ( $C_{f,s}$ ).

Vergelijking 3 kan dan worden herschreven als :

$$C_i = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{of} \quad \frac{C_i}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{vergelijking 4}).$$

Door toepassing van de vergelijking 4 kan de tijd worden geschat die nodig is om een bepaald percentage van de stationaire concentratie te bereiken voorzover een voorlopige schatting van  $k_2$  op basis van vergelijking 1 of vergelijking 2 beschikbaar is.

Als vuistregel geldt dat de optimale duur van de opnamefase voor het verkrijgen van statistisch aanvaardbare gegevens wat betreft  $\text{BCF}_k$  overeenstemt met de tijd die nodig is opdat de concentratie van de teststof in de vissen, uitgezet tegen de niet-getransformeerde tijd, ten minste het middelpunt  $1,6/k_2$  bereikt, oftewel 80 % van de stationaire concentratie, maar niet meer dan  $3,0/k_2$ , of 95 % van de stationaire concentratie (7).

De tijd die nodig is om 80 % van de stationaire concentratie te bereiken, bedraagt (vergelijking 4) :

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

Op dezelfde wijze kan worden berekend dat 95 % van de stationaire concentratie wordt bereikt na :

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

Bijvoorbeeld bedraagt de duur van de opnamefase ( $t_{op}$ ) voor een teststof met  $\log P_{ow} = 4$  bij benadering (op basis van de vergelijkingen 1, 5 en 6) :

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ d}^{-1}$$

$$t_{op} = t_{80} = 1,6/0,652, \text{ d.w.z. } 2,45 \text{ d (59 h)}$$

$$\text{of } t_{op} = t_{95} = 3,0/0,652, \text{ d.w.z. } 4,60 \text{ d (110 h)}.$$

Op analoge wijze kan voor een teststof waarvoor  $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$  ( $\log(s) = -5,0$ ) de duur van de opnamefase met behulp van de vergelijkingen 1, 2, 5 en 6 als volgt worden berekend :

$$\log_{10} (P_{ow}) = -0,862 \cdot (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ d}^{-1}$$

$$t_{op} = t_{80} = 1,6/0,246, \text{ d.w.z. } 6,5 \text{ d (156 h)}$$

$$\text{of } t_{op} = t_{95} = 3,0/0,246, \text{ d.w.z. } 12,2 \text{ d (293 h)}.$$

Als alternatief kan de uitdrukking

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

worden gebruikt om de tijd te berekenen die nodig is voor het daadwerkelijk bereiken van de stationaire situatie (4).

## 2. Voorspelling van de duur van de depuratiefase

Een schatting van de tijd die nodig is om de lichaamsconcentratie van een stof tot een bepaald percentage van de aanvankelijke concentratie terug te brengen, kan eveneens worden verkregen aan de hand van de algemene vergelijking van de opname- en depuratiekinetiek (eersteordekinetiek) (1) (8).

Voor de depuratiefase wordt  $C_w$  gelijkgesteld aan 0. De vergelijking wordt dan gereduceerd tot

$$\frac{dC_i}{dt} = -k_2 C_i \quad \text{of} \quad C_i = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

waarin  $C_{f,0}$  de concentratie is bij het begin van depuratiefase. 50 % depuratie wordt verkregen na  $t_{50}$ , die als volgt wordt berekend :

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

Zo ook wordt 95 % depuratie bereikt na

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

Als de opnamefase wordt afgesloten wanneer 80 % van de stationaire concentratie is bereikt ( $1,6/k_2$ ) en de depuratiefase wanneer de eliminatie 95 % belooft ( $3,0/k_2$ ), bedraagt de duur van de depuratiefase ongeveer het dubbele van de duur van de opnamefase.

Het is belangrijk hierbij op te merken dat al deze schattingen gebaseerd zijn op de onderstelling dat het opname- en het depuratieproces kunnen worden beschreven door een eersteordekinetiek. Als duidelijk is dat een eersteordekinetiek niet van toepassing is, dienen complexere modellen te worden gebruikt (zie bijvoorbeeld referentie (1)).

## Referenties (ad aanhangsel 3)

(1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish : comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.

(3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982). Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.

(4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.

(5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.

(6) Ernst W. (1985). Accumulation in Aquatic organisms. In : Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4, pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd, N.Y.

(7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977). Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish : Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere. 9, pp 3-19.

## Aanhangsel 4

Theoretisch voorbeeld van een bemonsteringsschema voor een bioconcentratietest met een stof waarvoor  $\log P_{ow} = 4$

Bemonstering vissen	Bemonsteringsschema		Aantal watermonsters	Aantal vissen per monster
	Minimale bemonstering : tijdstip (in dagen)	Extra monsternemingen		
<b>Opnamefase</b>	- 1 0		2 (*) 2	<b>Introductie van 45-80 vissen</b>
1e	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2e	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3e	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4e	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5e	4,7		2	6
<b>Depuratiefase</b>				<b>Vissen overbrengen naar water zonder de teststof</b>
6e	5,0	5,3		4 (4)
7e	5,9	7,0		4 (4)
8e	9,3	11,2		4 (4)
9e	14,0	17,5		6 (4)

(\*) Bemonster het water nadat ten minste reeds drie bakvolumes zijn doorgestroomd.

De cijfers tussen haakjes zijn de aantallen extra monsters (van het water en de vissen) die worden genomen ingeval voor een aanvullende bemonstering werd geopteerd.

NB : De preliminaire, aan de test voorafgaande schatting van  $k_2$  op basis van  $\log P_{ow} = 4,0$  bedraagt  $0,652 \text{ dag}^{-1}$ . De totale duur van het experiment wordt gelijkgesteld aan

$3 \times t_{0,95} = 3 \times 4,6$  dagen, d.w.z. 14 dagen. Voor de schatting van  $t_{0,95}$ , zie aanhangsel 3.



## Aanhangsel 5

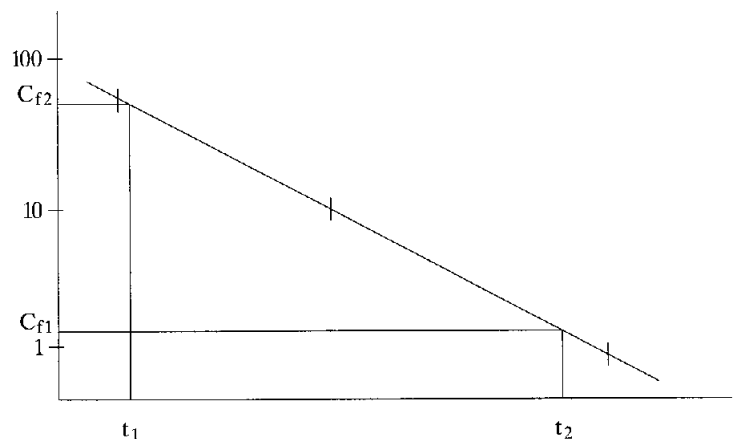
## Keuze van een model

Er is van uitgegaan dat de meeste bioconcentratieprocessen op een „acceptabele” manier worden beschreven door een simpel twee-compartiment/twee-parametermodel, wat zich vertaalt in een lineair verband wanneer de concentratie van de stof in de vissen tijdens de depuratiefase op semi-logaritmisch papier tegen de tijd wordt uitgezet. Wanneer de trend in de desbetreffende gegevens niet door een rechte kan worden beschreven, dient een complexer model te worden gebruikt. Zie daarvoor bijvoorbeeld de publicatie van Spacie en Hamelink (referentie 1 in aanhangsel 3).

Grafische methode voor de bepaling van de depuratie-(eliminatie)-snelheidsconstante  $k_2$ 

Zet de concentratie van de teststof in ieder vismonster op semi-logaritmisch papier uit tegen het bemonsterings-tijdstip. De richtingscoëfficiënt van de trendlijn is  $k_2$ .

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



Houd er rekening mee dat afwijkingen van een lineair verband tussen  $\log C_f$  en  $t$  een aanwijzing kunnen vormen voor een complex depuratiepatroon dat niet door een eersteordekinetiek kan worden beschreven. Om depuratiepatronen door te rekenen die niet door een eersteordekinetiek worden gekenmerkt, kunnen eveneens grafische methoden worden gebruikt.

Grafische methode voor de bepaling van de opnamesnelheidsconstante  $k_1$ 

Als  $k_2$  bekend is, kan  $k_1$  als volgt worden berekend :

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

De waarde van  $C_f$  wordt afgelezen op de helft van de hoogte van de geëffende opnamecurve die wordt verkregen wanneer de concentratie van de stof in de vissen (op logaritmische schaal) wordt uitgezet tegen die tijd (op lineaire schaal).

## Computermethode voor de berekening van de opname- en de depuratie-(eliminatie)-snelheidsconstante

Voor de berekening van de bioconcentratiefactor en de snelheidsconstanten  $k_1$  en  $k_2$  verdient het de voorkeur gebruik te maken van gecomputeriseerde niet-lineaire parameterschattingstechnieken. Deze programma's berekenen een waarde voor  $k_1$  en  $k_2$  op basis van de aan de tijd gerelateerde concentratiegegevens en het model :

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

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-t_2 t}) \quad t < t_c \quad (\text{vergelijking 3})$$

waarin  $t_c$  = het moment waarop de opnamefase wordt afgebroken.

Met deze techniek wordt ook een schatting van de standaardafwijking van  $k_1$  en  $k_2$  verkregen.

Aangezien  $k_2$  in de meeste gevallen met een vrij grote precisie uit de depuratiecurve kan worden geschat, en aangezien er tussen de parameters  $k_1$  en  $k_2$  een sterke correlatie bestaat als zij gelijktijdig worden geschat, kan het wenselijk zijn eerst, en uitsluitend aan de hand van de depuratiegegevens,  $k_2$  te berekenen en vervolgens  $k_1$  uit de opnamegegevens te schatten door middel van niet-lineaire regressie.

Gezien om te worden gevoegd bij Ons besluit van 4 februari 2000.

ALBERT

Van Koningswege :

De Minister van Consumentenzaken, Volksgezondheid en Leefmilieu,

Mevr. M. AELVOET

## ANNEXE I

## A.18. DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE MOYENNE EN NOMBRE ET DE LA DISTRIBUTION DES MASSES MOLÉCULAIRES DES POLYMÈRES

## 1. METHODE

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). Les principes fondamentaux et tous autres renseignements techniques sont donnés en référence.

## 1.1. Introduction

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la masse moléculaire moyenne à l'aide d'autres méthodes (voir Annexe). Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après est basée sur la norme DIN 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

## 1.2. Définitions et unités

La masse moléculaire moyenne en nombre  $M_n$  et la masse moléculaire moyenne en poids  $M_w$  sont déterminées à l'aide des équations suivantes :

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

où

$H_i$  est l'amplitude du signal du détecteur, par rapport au niveau de référence, correspondant au volume de rétention  $V_i$ ;

$M_i$  est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention  $V_i$  et

$n$  est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport  $M_w/M_n$ .

## 1.3. Substances de référence

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$ , ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'éluion n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives et sont désignées par le terme « masses moléculaires en équivalent polystyrène ». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurales entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylène glycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

## 1.4. Principe de la méthode

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes ( $M_n$ ,  $M_w$ ). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter tout au moins l'interférence de certains effets d'absorption. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible, par exemple divers polystyrènes étalons. Une courbe de Gauss en résulte généralement, parfois avec une dissymétrie marquée du côté des faibles masses moléculaires, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

### 1.5. Critères de qualité

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'éluion doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'assurer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut (1). Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons. Dans le cas des polystyrènes étalons, les valeurs typiques sont :

$M_p < 2\ 000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\ 000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

( $M_p$  est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

### 1.6. Description de la méthode

#### 1.6.1. Préparation des solutions de polystyrène étalon

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm x 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100  $\mu$ l. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250  $\mu$ l. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

#### 1.6.2. Préparation de la solution de l'échantillon

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue dans les mêmes conditions. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le tétrahydrofurane (THF), en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2  $\mu$ m.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

#### 1.6.3. Appareillage

- un réservoir à solvant,
- un système de dégazage (si nécessaire),
- une pompe,
- un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),
- un système d'injection,
- des colonnes de chromatographie,
- un détecteur,
- un débitmètre (si nécessaire),
- un système d'enregistrement et de traitement des données,
- un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis des solvants utilisés (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

#### 1.6.4. Injection et système de distribution du solvant

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de distribution du solvant doit, dans la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.

#### 1.6.5. Colonne

Selon la nature de l'échantillon à tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

#### 1.6.6. Plateaux théoriques

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'éluion est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'éthylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante :

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

où :

N est le nombre de plateaux théoriques

$V_e$  est le volume d'éluion correspondant au maximum du pic

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$  est la largeur du pic à mi-hauteur.

### 1.6.7. Efficacité de la séparation

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante :

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

où

$V_{e,M_x}$  est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire  $M_x$

$V_{e,(10M_x)}$  est le volume d'élution du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure

La résolution du système est généralement définie comme suit :

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où,

$V_{e1}$ ,  $V_{e2}$  sont les volumes d'élution des deux polystyrènes étalons au maximum du pic

$W_1$ ,  $W_2$  sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base

$M_1$ ,  $M_2$  sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles devraient différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

### 1.6.8. Solvants

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 % de pureté). Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompé vers la colonne.

### 1.6.9. Régulation de la température

La température des composants internes critiques (boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux) doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

### 1.6.10. Détecteur

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élué de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10  $\mu\text{l}$ , sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'élution l'exigent, on peut toutefois utiliser d'autres types de détecteurs tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc...

## 2. RESULTATS ET PROCES-VERBAL D'ESSAI

### 2.1. Résultats

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, il est nécessaire de réaliser deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Les paramètres  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$ ,  $M_p$  doivent être déterminés pour chaque mesure. Il est nécessaire d'indiquer de façon explicite que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant à des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de  $\log M_p$  ( $M_p$  représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis pour la courbe dans son ensemble, qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. Les masses moléculaires moyennes en nombre et en poids sont généralement déterminées par un traitement électronique des données fondé sur les formules décrites dans la section 1.2. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du  $\log M$ ). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

### 2.2. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants :

#### 2.2.1. Substance à tester

— renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),

— description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

*2.2.2. Dispositif expérimental*

- réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,
- pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,
- colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques des colonnes, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),
- nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),
- informations sur la symétrie des pics,
- température de la colonne, mode de régulation de la température,
- détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),
- débitmètre, s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),
- système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

*2.2.3. Etalonnage du système*

- description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,
- précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),
- informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours de la procédure expérimentale, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,
- toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes :
  - nom de l'échantillon,
  - fabricant de l'échantillon,
  - valeurs caractéristiques  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  des étalons fournis par le fabricant ou déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,
  - volume d'injection et concentration d'injection,
  - valeur de  $M_p$  utilisée pour l'étalonnage,
  - volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,
  - $M_p$  calculée au maximum du pic,
  - pourcentage d'erreur sur la  $M_p$  calculée et sur la valeur d'étalonnage.

*2.2.4. Evaluation*

- évaluation en fonction du temps : toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de correction, étalon interne, etc.),
- préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,
- indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analysé,
- décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours,
- décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,
- indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,
- indiquer le volume d'injection ( $\mu\text{l}$ ) et la concentration d'injection ( $\text{mg/ml}$ ),
- mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,
- décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,
- préciser les intervalles d'erreur,
- consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

**3. REFERENCES**

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. and Bly, D.D. (eds) (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley & Sons.
- (3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.
- (4) ASTM D 5296-92 (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

## Annexe

**Exemples d'autres méthodes de détermination de la masse moléculaire moyenne en nombre ( $M_n$ ) des polymères**

La chromatographie sur gel perméable constitue la méthode de choix pour la détermination de  $M_n$ , en particulier lorsqu'on dispose d'un ensemble de substances étalons de structure comparable à la structure du polymère. Toutefois, lorsque le recours à la chromatographie sur gel perméable présente des difficultés pratiques ou que l'on peut s'attendre à ce que la substance ne satisfasse pas à un critère réglementaire pour la  $M_n$  (ce qui demande confirmation), il existe des méthodes de remplacement, par exemple :

**1. Utilisation des propriétés colligatives**

1.1. *Ebullioscopie et cryoscopie* : consistent à mesurer l'élévation du point d'ébullition (ébullioscopie) ou l'abaissement du point de congélation (cryoscopie) d'un solvant lorsque le polymère est ajouté. La méthode est basée sur le fait que la dissolution d'un polymère dans un liquide exerce sur les points d'ébullition et de congélation de celui-ci un effet qui dépend de la masse moléculaire du polymère (1) (2).

Le domaine d'application correspond à  $M_n < 20\ 000$ .

1.2. *Abaissement de la pression de vapeur* : consiste à mesurer la pression de vapeur d'un liquide de référence avant et après addition de quantités connues de polymères (1) (2).

Le domaine d'application correspond à  $M_n < 20\ 000$  (théoriquement; en pratique, ne présente toutefois qu'une valeur limitée).

1.3. *Osmométrie à membrane* : repose sur le principe de l'osmose, à savoir la tendance naturelle des molécules de solvant à traverser une membrane semi-perméable à partir d'une solution diluée vers une solution concentrée de manière à réaliser l'équilibre. Dans l'essai, la concentration de la solution diluée est nulle tandis que la solution concentrée contient le polymère. Le passage de solvant à travers la membrane induit une différence de pression qui dépend de la concentration et de la masse moléculaire du polymère (1) (3) (4).

Le domaine d'application correspond à des valeurs de  $M_n$  comprises entre 20 000 et 200 000.

1.4. *Osmométrie en phase vapeur* : consiste à comparer la vitesse d'évaporation d'un aérosol de solvant pur à celle de trois aérosols au moins contenant le polymère à différentes concentrations (1) (5) (6).

Le domaine d'application correspond à  $M_n < 20\ 000$ .

**2. Analyse des groupes terminaux**

Pour utiliser cette méthode, il est nécessaire de connaître à la fois la structure globale du polymère et la nature des groupes terminaux situés en bout de chaîne (ceux-ci doivent pouvoir être distingués de la chaîne principale par exemple, par leur spectre RMN ou par titrage et formation de dérivés). La détermination de la concentration moléculaire des groupes terminaux présents sur le polymère peut, ensuite, fournir une valeur de la masse moléculaire (7) (8) (9).

Le domaine d'application correspond à des valeurs de  $M_n$  pouvant atteindre 50 000 (avec une fiabilité décroissante).

**REFERENCES DE L'ANNEXE**

- (1) Billmeyer, F.W. Jr. (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C.A. (1975). Absolute Colligative Property Methods, Chapter 4, in Polymer Molecular Weights, Part I (ed. P.E. Slade, Jr.), Marcel Dekker, New York.
- (3) ASTM D 375-79 (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane osmometry, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.
- (4) Coll, H. (1989). Membrane osmometry, in : Determination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
- (5) ASTM D 3592-77 (1977). Standard recommended practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.
- (6) Morris, C.E.M. (1989). Vapour Pressure Osmometry in Determination of Molecular Weight (ed. A.R. Cooper), J. Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E. Müller, G. & Arndt, K.-F. (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R.G. (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 in Polymer Molecular Weights, Part I, (ed. P.E. Slade, Jr.) Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S. et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 4 février 2000.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

## ANNEXE II

## A.19 DETERMINATION DE LA TENEUR EN POLYMERES DE FAIBLE MASSE MOLECULAIRE

## 1. METHODE

Cette méthode de chromatographie sur gel perméable reprend la ligne directrice OCDE TG 118 (1996). On trouvera dans les références les principes fondamentaux et autres renseignements techniques.

## 1.1. Introduction

Les propriétés des polymères sont tellement diversifiées qu'il est impossible de décrire une méthode unique indiquant avec précision des conditions de séparation et d'évaluation qui recouvrent toutes les éventualités et particularités rencontrées dans la séparation des polymères. Les systèmes complexes de polymères, notamment, se prêtent rarement à la chromatographie sur gel perméable. Lorsque la chromatographie sur gel perméable n'est pas applicable, on peut déterminer la teneur en polymères de faible masse moléculaire à l'aide d'autres méthodes. Dans de tels cas, il convient de fournir tous les détails de la méthode utilisée et de justifier son choix.

La méthode décrite ci-après se fonde sur la norme DIN 55672 (1). Celle-ci fournit des indications détaillées sur la manière de réaliser les expériences et d'évaluer les données. S'il est nécessaire de modifier les conditions expérimentales, ces changements doivent être justifiés. D'autres normes peuvent être utilisées, à condition d'en mentionner toutes les références. La méthode décrite fait appel à des échantillons de polystyrène de polydispersité connue pour l'étalonnage et il y aura peut-être lieu de la modifier pour l'adapter aux cas de polymères particuliers, par exemple, les polymères solubles dans l'eau et les polymères ramifiés à longue chaîne.

## 1.2. Définitions et unités

On définit arbitrairement une masse moléculaire faible comme étant une masse moléculaire inférieure à 1 000 daltons.

La masse moléculaire moyenne en nombre  $M_n$  et la masse moléculaire moyenne en poids  $M_w$  sont déterminées à l'aide des équations suivantes :

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

où

$H_i$  est l'amplitude du signal du détecteur correspondant au volume de rétention  $V_i$ , par rapport au niveau de référence

$M_i$  est la masse moléculaire de la fraction de polymère correspondant au volume de rétention,  $V_i$  et

$n$  est le nombre de points expérimentaux.

La largeur de la distribution des masses moléculaires, qui représente une mesure de la polydispersité du système, est donnée par le rapport  $M_w/M_n$ .

## 1.3. Substances de référence

La méthode par chromatographie sur gel perméable étant une méthode relative, il est nécessaire de procéder à un étalonnage. Celui-ci est généralement effectué au moyen de polystyrènes étalons à chaîne linéaire et à distribution étroite, dont les masses moléculaires moyennes  $M_n$  et  $M_w$ , ainsi que la distribution des masses moléculaires sont connues. La courbe d'étalonnage ne peut être utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'un échantillon inconnu que si les conditions de séparation des échantillons et des étalons ont été sélectionnées de manière identique.

Une relation déterminée entre la masse moléculaire et le volume d'éluion n'est valable que dans les conditions particulières d'une expérience donnée. Parmi ces conditions figurent, avant tout, la température, le solvant (ou le mélange de solvants), les conditions de chromatographie, ainsi que la colonne de séparation ou le système de colonnes.

Les masses moléculaires de l'échantillon déterminées de cette manière constituent des valeurs relatives; on les désigne par le terme « masses moléculaires en équivalent-polystyrène ». Cela signifie qu'en fonction des différences chimiques et structurelles entre l'échantillon à tester et les étalons, les masses moléculaires peuvent dévier des valeurs absolues de manière plus ou moins importante. Si d'autres étalons sont utilisés, par exemple le polyéthylène glycol, le poly(éthylène oxyde), le poly(méthacrylate de méthyle) ou l'acide polyacrylique, il importe d'en indiquer la raison.

## 1.4. Principe de la méthode

La chromatographie sur gel perméable permet de déterminer la distribution des masses moléculaires ainsi que les masses moléculaires moyennes ( $M_n$ ,  $M_w$ ). La chromatographie sur gel perméable constitue un type particulier de chromatographie liquide dans lequel l'échantillon à tester est séparé en fonction des volumes hydrodynamiques de chaque constituant (2).

La séparation s'effectue à mesure que l'échantillon progresse dans une colonne remplie d'un matériau poreux, généralement un gel organique. Les petites molécules peuvent pénétrer dans les pores tandis que les grosses molécules en sont exclues. Le parcours des grosses molécules est, de ce fait, plus court; elles sont éluées en premier lieu. Les molécules de taille moyenne pénètrent dans certains des pores; elles sont éluées plus tard. Les molécules les plus petites, dont le rayon hydrodynamique moyen est plus petit que les pores du gel, peuvent pénétrer dans tous les pores. Elles sont éluées en dernier lieu.

Dans la situation idéale, c'est la taille des espèces moléculaires qui régit entièrement la séparation, mais, en pratique, il est difficile d'éviter l'interférence de certains effets d'absorption au moins. Un remplissage irrégulier de la colonne, de même que des volumes morts, peuvent aggraver la situation (2).

La détection s'effectue, par exemple, par mesure de l'indice de réfraction ou de l'absorption dans l'UV pour donner une courbe de distribution simple. Cependant, pour pouvoir associer à la courbe des valeurs de masses moléculaires réelles, il est nécessaire d'étalonner la colonne par passage de polymères de masse moléculaire connue et, idéalement, d'une structure aussi proche que possible. Une courbe de Gauss en résulte généralement; elle présente parfois une dissymétrie marquée du côté des masses moléculaires faibles, l'axe vertical indiquant la quantité, en poids, des espèces de différentes masses moléculaires éluées, tandis que sur l'axe horizontal figure le logarithme de la masse moléculaire.

La teneur en polymères de faible masse moléculaire est déduite de cette courbe. Le calcul ne peut être exact que si les espèces à faible masse moléculaire se comportent de la même manière, par unité de masse, que l'ensemble du polymère.

### 1.5. Critères de qualité

La reproductibilité (écart-type relatif) du volume d'éluion doit être au plus égale à 0,3 pour cent. Il y a lieu d'améliorer la reproductibilité de l'analyse grâce à une correction mettant en jeu un étalon interne, si un chromatogramme est évalué en fonction du temps et ne satisfait pas aux critères mentionnés plus haut [voir informations complémentaires en (1)]. Les polydispersités dépendent des masses moléculaires des étalons; dans le cas des polystyrènes étalons :

$M_p < 2\ 000$	$M_w/M_n < 1,20$
$2\ 000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1,05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1,20$

( $M_p$  est la masse moléculaire de l'étalon correspondant au maximum du pic)

### 1.6. Description de la méthode

#### 1.6.1. Préparation des solutions de polystyrène étalon

On dissout les polystyrènes étalons en les mélangeant soigneusement à l'éluant choisi. On préparera les solutions en observant les recommandations du fabricant.

Les concentrations des étalons choisis dépendent de différents facteurs, comme le volume d'injection, la viscosité de la solution et la sensibilité du détecteur. Le volume d'injection maximum doit être adapté à la longueur de la colonne, en veillant à ne pas surcharger celle-ci. Les volumes d'injection courants pour des séparations analytiques par chromatographie sur gel perméable, au moyen d'une colonne de 30 cm x 7,8 mm, varient normalement entre 40 et 100  $\mu$ l. Il est possible d'injecter des volumes plus importants, mais ceux-ci ne peuvent dépasser 250  $\mu$ l. On doit déterminer le rapport optimal entre le volume d'injection et la concentration avant l'étalonnage de la colonne.

#### 1.6.2. Préparation de la solution de l'échantillon

En principe, la préparation des solutions de l'échantillon s'effectue selon les mêmes critères. L'échantillon est dissous dans un solvant approprié, par exemple le THF, en agitant soigneusement. Il ne doit, en aucun cas, être dissous dans un bain à ultrasons. Si nécessaire, la solution de l'échantillon est purifiée au moyen d'un filtre à membrane d'une dimension de pores comprise entre 0,2 et 2  $\mu$ m.

La présence de particules non dissoutes doit être mentionnée dans le rapport final, dans la mesure où elle peut résulter d'espèces de masse moléculaire élevée. Il faut recourir à une méthode appropriée pour déterminer le pourcentage en poids des particules non dissoutes. Les solutions doivent être analysées dans un délai de 24 heures.

#### 1.6.3. Correction liée à la présence d'impuretés et d'additifs

S'agissant de la teneur en espèces de  $M < 1\ 000$ , il est généralement nécessaire d'apporter une correction pour tenir compte de la présence de composés particuliers non polymériques (par exemple des impuretés ou des additifs), sauf si la teneur mesurée n'excède pas un pour cent. Cette correction peut être réalisée par analyse directe de la solution de polymère ou de l'éluat de la chromatographie sur gel perméable.

Au cas où l'éluat est trop dilué pour permettre une analyse après passage à travers la colonne, il convient de le concentrer. Il est éventuellement nécessaire d'évaporer l'éluat à sec puis de le redissoudre. La concentration de l'éluat sera effectuée dans des conditions telles qu'aucune modification de sa composition n'intervienne. Le traitement de l'éluat après la phase de chromatographie sur gel perméable est fonction de la méthode d'analyse utilisée pour la détermination quantitative.

#### 1.6.4. Appareillage

Un appareil de chromatographie sur gel perméable se compose des éléments suivants :

- un réservoir à solvant,
- un système de dégazage (si nécessaire),
- une pompe,
- un amortisseur d'impulsions (si nécessaire),
- un système d'injection,
- des colonnes de chromatographie,
- un détecteur,
- un débitmètre (si nécessaire),
- un système d'enregistrement et de traitement des données,
- un récipient pour recueillir les solutions usées.

On doit vérifier que le système de chromatographie sur gel perméable est inerte vis-à-vis du solvant utilisé (par exemple, utilisation de capillaires en acier lorsque le solvant est le THF).

#### 1.6.5. Injection et système de pompage du solvant

Un volume défini de la solution de l'échantillon est chargé sur la colonne dans une zone étroitement définie, à l'aide d'un échantillonneur automatique ou manuellement. Si on opère manuellement, le fait de retirer ou d'enfoncer le piston de la seringue trop rapidement peut provoquer des modifications dans la distribution des masses moléculaires observées. Le système de pompage du solvant doit, dans toute la mesure du possible, être exempt de pulsations; il est souhaitable qu'il comporte un amortisseur d'impulsions. Le débit est de l'ordre de 1 ml/min.



### 1.6.6. Colonne

Selon la nature de l'échantillon à tester, le polymère est caractérisé en ayant recours à une seule colonne ou à plusieurs colonnes connectées en série. Un certain nombre de matériaux poreux pour colonne de propriétés définies (par exemple taille des pores, limites d'exclusion) sont disponibles dans le commerce. Le choix du gel de séparation ou celui de la longueur de la colonne dépendent, d'une part, des propriétés de l'échantillon à tester (volumes hydrodynamiques, distribution des masses moléculaires), d'autre part, des conditions particulières de la séparation, telles que la nature du solvant, la température et le débit (1) (2) (3).

### 1.6.7. Plateaux théoriques

La colonne ou la combinaison de colonnes utilisée pour la séparation doit être caractérisée par le nombre de plateaux théoriques. Pour ce faire, dans le cas où le solvant d'éluion est le THF, il y a lieu de faire passer une solution d'éthylbenzène ou d'un autre soluté non polaire approprié sur une colonne de longueur connue. Le nombre de plateaux théoriques est donné par l'équation suivante :

$$N = 5,54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

où

N est le nombre de plateaux théoriques

$V_e$  est le volume d'éluion correspondant au maximum du pic

W est la largeur du pic au niveau de la ligne de base

$W_{1/2}$  est la largeur du pic à mi-hauteur.

### 1.6.8. Efficacité de la séparation

Outre le nombre de plateaux théoriques, paramètre déterminant la largeur de bande, l'efficacité de séparation est une autre grandeur caractéristique; c'est la pente de la courbe de calibrage qui la détermine. L'efficacité de séparation d'une colonne se détermine au moyen de la relation suivante :

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10.M_x)}}{\text{section de la colonne}} \geq 6,0 \left[ \frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

où

$V_{e,M_x}$  est le volume d'éluion du polystyrène de masse moléculaire  $M_x$ .

$V_{e,(10.M_x)}$  est le volume d'éluion du polystyrène de masse moléculaire 10 fois supérieure.

La résolution du système est généralement définie comme suit :

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

où,

$V_{e1}$ ,  $V_{e2}$  sont les volumes d'éluion des deux polystyrènes étalons au maximum du pic.

$W_1$ ,  $W_2$  sont les largeurs des pics au niveau de la ligne de base.

$M_1$ ,  $M_2$  sont les masses moléculaires correspondant au maximum des pics (elles doivent différer d'un facteur 10).

La valeur de R pour le système de colonnes doit être supérieure à 1,7 (4).

### 1.6.9. Solvants

Tous les solvants doivent être d'une grande pureté (on emploie du THF à 99,5 pour cent de pureté). Le réservoir de solvant (mis, au besoin, sous atmosphère de gaz inerte) doit être assez grand pour permettre l'étalonnage de la colonne et plusieurs analyses d'échantillons. Le solvant sera dégazé avant d'être pompé vers la colonne.

### 1.6.10. Régulation de la température

La température des composants internes critiques [boucle d'injection, colonne(s), détecteur et tuyaux] doit être constante et compatible avec le choix du solvant.

### 1.6.11. Détecteur

Le détecteur sert à enregistrer de manière quantitative la concentration de l'échantillon qui est élué de la colonne. En vue d'éviter un élargissement indésirable des pics, le volume de la cuvette du détecteur sera choisi aussi petit que possible. Il ne doit pas excéder 10  $\mu\text{l}$ , sauf pour les détecteurs par diffusion de la lumière et les viscosimètres. La détection s'effectue généralement par réfractométrie différentielle. Toutefois, si les propriétés spécifiques de l'échantillon ou du solvant d'éluion l'exigent, d'autres types de détecteurs peuvent être utilisés tels que les détecteurs UV/VIS ou IR, les viscosimètres, etc.

## 2. RESULTATS ET PROCES-VERBAL D'ESSAI

### 2.1. Résultats

On se référera à la norme DIN (1) pour ce qui concerne les critères d'évaluation détaillés, de même que pour les spécifications relatives à la collecte et au traitement des données.

Pour chaque échantillon analysé, on réalisera deux expériences indépendantes. Leurs résultats seront analysés séparément.

Il est nécessaire d'indiquer explicitement que les valeurs mesurées sont des valeurs relatives correspondant à des équivalents de masse moléculaire de l'étalon utilisé.

Dans tous les cas, il est essentiel de déterminer aussi les données relatives aux blancs, ceux-ci étant traités de la même manière que les échantillons.

Après avoir déterminé les volumes et les temps de rétention (éventuellement corrigés au moyen d'un étalon interne), on porte en graphique les valeurs de  $\log M_p$  ( $M_p$  représentant les maxima des pics des polymères d'étalonnage) en fonction de l'une de ces quantités. Deux points d'étalonnage au moins sont nécessaires pour chaque facteur 10 de masse moléculaire; cinq points de mesure au moins sont requis, pour la courbe dans son ensemble qui doit couvrir la masse moléculaire estimée de l'échantillon. Le point extrême de la courbe d'étalonnage du côté des faibles masses moléculaires peut être défini grâce au n-hexylbenzène ou à un autre soluté non polaire approprié. On détermine la portion de la courbe correspondant aux masses moléculaires inférieures à 1 000 et on la corrige, si nécessaire, pour tenir compte des impuretés et des additifs. Les courbes d'élution sont généralement évaluées au moyen d'un système électronique de traitement des données. Si on a recours à un traitement manuel, il est opportun de consulter l'ASTM D 3536-91 (3).

Si un polymère insoluble est retenu sur la colonne, sa masse moléculaire est vraisemblablement supérieure à celle de la fraction soluble et il faut en tenir compte pour éviter de surestimer la teneur en polymères de faible masse moléculaire. On trouvera en annexe des indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles.

La courbe de distribution doit être présentée sous la forme d'un tableau ou d'un graphique (fréquence différentielle ou pourcentages cumulatifs en fonction du  $\log M$ ). Dans la représentation graphique, une puissance de dix de masse moléculaire doit normalement correspondre à une largeur de 4 cm environ, tandis que pour le maximum du pic une hauteur de 8 cm environ est adéquate. Dans le cas de courbes de distribution cumulatives, la différence entre 0 et 100 pour cent sur l'axe des ordonnées doit être d'environ 10 cm.

## 2.2. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants :

### 2.2.1. Substance à tester

- renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés),
- description du traitement de l'échantillon, observations, problèmes.

### 2.2.2. Dispositif expérimental

- réservoir d'éluant, gaz inerte, dégazage de l'éluant, composition de l'éluant, impuretés,
- pompe, amortisseur d'impulsions, système d'injection,
- colonnes de séparation (fabricant, toutes précisions sur les caractéristiques de la colonne, telles que taille des pores, nature du matériel de séparation, etc., nombre, longueur et ordre des colonnes utilisées),
- nombre de plateaux théoriques de la colonne (ou de la combinaison de colonnes), efficacité de la séparation (résolution du système),
- informations sur la symétrie des pics,
- température de la colonne, mode de régulation de la température,
- détecteur (principe de mesure, type, volume de la cuvette),
- débitmètre s'il y en a un (fabricant, principe de mesure),
- système utilisé pour rassembler et pour traiter les données (matériel et logiciel).

### 2.2.3. Etalonnage du système

- description détaillée de la méthode utilisée pour établir la courbe d'étalonnage,
- précisions sur les critères de qualité propres à cette méthode (par exemple, coefficient de corrélation, erreur quadratique moyenne, etc.),
- informations sur toutes les extrapolations, hypothèses et approximations effectuées au cours des processus expérimentaux, ainsi que sur l'évaluation et le traitement des données,
- toutes les mesures effectuées pour établir la courbe d'étalonnage doivent être présentées dans un tableau qui comporte, pour chaque point d'étalonnage, les informations suivantes :
  - nom de l'échantillon,
  - fabricant de l'échantillon,
  - valeurs caractéristiques  $M_p$ ,  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_w/M_n$  des étalons fournies par le fabricant déduites de mesures ultérieures, complétées d'indications relatives à la méthode de détermination,
  - volume d'injection et concentration d'injection,
  - valeur de  $M_p$  utilisée pour l'étalonnage,
  - volume d'élution ou temps de rétention corrigé mesuré aux maxima des pics,
  - $M_p$  calculée au maximum du pic,
  - pourcentage d'erreur sur la  $M_p$  calculée et sur la valeur d'étalonnage.

### 2.2.4. Renseignements sur la teneur en polymères de faible masse moléculaire

- description des méthodes d'analyse utilisées et de la manière dont les expériences ont été menées,
- informations sur le pourcentage que représente la teneur en espèces de faible masse moléculaire (poids/poids) par rapport à l'ensemble de l'échantillon,
- informations sur les impuretés, les additifs et les autres substances non polymériques en pourcentage pondéral de l'ensemble de l'échantillon.

### 2.2.5. Evaluation

- évaluation en fonction du temps : toutes méthodes visant à améliorer la reproductibilité requise (méthode de corrections, étalon interne, etc.),
- préciser si l'évaluation a été effectuée à partir du volume d'élution ou à partir du temps de rétention,
- indiquer les limites de l'évaluation si un pic n'est pas complètement analysé,
- décrire les méthodes de lissage lorsqu'on y a recours,
- décrire les procédés de préparation et de prétraitement de l'échantillon,
- indiquer la présence de particules non dissoutes, s'il y en a,
- indiquer le volume d'injection ( $\mu\text{l}$ ) et la concentration d'injection ( $\text{mg/ml}$ ),
- mentionner les observations témoignant d'effets qui engendrent des déviations par rapport au profil idéal de chromatographie sur gel perméable,
- décrire en détail toutes les modifications aux procédures d'essais,
- préciser les intervalles d'erreur,
- consigner toutes autres informations et observations utiles pour interpréter les résultats.

### 3. REFERENCES

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J. et Bly, D.D. (eds.) (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J.Wiley & Sons.
- (3) ASTM D 3536-91 (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, Pennsylvanie.

### Annexe

#### Indications permettant de corriger la teneur en polymères de faible masse moléculaire pour tenir compte des polymères insolubles

La présence d'un polymère insoluble dans un échantillon entraîne une perte de masse au cours de l'analyse par chromatographie sur gel perméable. Le polymère insoluble est irréversiblement retenu sur la colonne ou sur le filtre à échantillon lorsque la partie soluble de l'échantillon traverse la colonne. Si l'indice de réfraction différentiel ( $dn/dc$ ) du polymère peut être estimé ou mesuré, il est possible d'estimer la masse que l'échantillon a perdue sur la colonne. Dans ce cas, on effectue une correction à l'aide d'un étalonnage externe du réfractomètre, avec des étalons dont on connaît la concentration et le  $dn/dc$ . Dans l'exemple qui suit, on utilise un étalon de poly(méthacrylate de méthyle).

L'étalonnage externe pratiqué lors de l'analyse des polymères acryliques consiste à analyser par chromatographie sur gel perméable une solution étalon de concentration connue de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofurane; les résultats servent à calculer la constante du réfractomètre selon l'équation suivante :

$$K = R / (C \times V \times dn/dc)$$

où

K est la constante du réfractomètre (microvolts secondes/ml)

R est la réponse de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) (microvolts secondes)

C est la concentration de l'étalon de poly(méthacrylate de méthyle) ( $\text{mg/ml}$ )

V est le volume d'injection (ml)

et

$dn/dc$  est l'indice de réfraction différentiel d'une solution de poly(méthacrylate de méthyle) dans du tétrahydrofurane ( $\text{ml/mg}$ ).

Les données suivantes caractérisent généralement un étalon de poly(méthacrylate de méthyle) :

R = 2 937 891;

C = 1,07  $\text{mg/ml}$ ;

V = 0,1 ml;

$dn/dc = 9 \cdot 10^{-5} \text{ ml/mg}$ .

La valeur de K résultante,  $3,05 \times 10^{11}$ , est ensuite utilisée pour calculer la réponse théorique du détecteur, c'est-à-dire celle qu'on obtiendrait si 100 pour cent du polymère injecté était élué à travers le détecteur.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 4 février 2000.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

## ANNEXE III

## A.20. COMPORTEMENT DE DISSOLUTION - EXTRACTION DES POLYMERES DANS L'EAU

## 1. METHODE

La méthode décrite reprend la version révisée de la ligne directrice OCDE TG 120 (1997). On trouvera davantage de renseignements techniques en référence (1).

## 1.1. Introduction

Dans le cas de certains polymères, tels que les polymères en émulsion, un travail préparatoire initial peut être nécessaire avant utilisation de la méthode exposée. La méthode n'est pas applicable aux polymères liquides ni aux polymères qui réagissent avec l'eau dans les conditions d'essai.

Lorsque la méthode est difficile ou impossible à mettre en pratique, le comportement de dissolution-extraction des polymères peut être étudié par d'autres méthodes. Dans ce cas, la méthode utilisée devra être entièrement détaillée et justifiée.

## 1.2. Substances de référence

Néant

## 1.3. Principe de la méthode

Le comportement de dissolution - extraction des polymères en milieu aqueux est déterminé par la méthode du flacon (voir A.6., Solubilité dans l'eau, méthode du flacon), en y apportant les modifications décrites ci-après.

## 1.4. Critères de qualité

Néant

## 1.5. Description de la méthode

## 1.5.1. Appareillage

L'appareillage nécessaire à l'application de la méthode est le suivant :

- un dispositif permettant de réduire l'échantillon en poudre, tel qu'un broyeur produisant des particules de taille déterminée (1)
- un système d'agitation avec possibilité de régler la température
- un système de filtration sur membrane
- un dispositif d'analyse
- des tamis normalisés.

## 1.5.2. Préparation de la solution de l'échantillon

Il convient de réduire d'abord un échantillon représentatif à l'état de particules d'une taille comprise entre 0,125 et 0,25 mm en utilisant des tamis appropriés. Il peut être nécessaire de refroidir pour garantir la stabilité de l'échantillon ou pour procéder au broyage. Les matériaux du type du caoutchouc peuvent être pulvérisés à la température de l'azote liquide (1).

S'il n'est pas possible d'obtenir des particules de la dimension requise, on doit s'efforcer de réduire autant que possible la taille des particules et consigner le résultat. Dans le rapport, il est nécessaire d'indiquer comment l'échantillon pulvérisé a été conservé avant l'analyse.

## 1.5.3. Procédure

On pèse trois échantillons de la substance à tester, de 10 g chacun, dans trois récipients pourvus de bouchons en verre et on ajoute 1 000 ml d'eau dans chacun des récipients. Si la manipulation de 10 g de polymère s'avère impossible, il convient d'utiliser la quantité la plus grande qui puisse être manipulée, le volume d'eau étant ajusté en proportion.

Les récipients sont soigneusement bouchés, puis agités à 20 °C. On doit employer un dispositif d'agitation qui puisse fonctionner à température constante. Après une période de 24 heures, le contenu de chaque récipient est centrifugé ou filtré et la concentration du polymère dans la phase aqueuse limpide est déterminée à l'aide d'une méthode d'analyse appropriée. S'il n'existe pas de méthode permettant une analyse adéquate de la phase aqueuse, on peut obtenir une estimation de la solubilité-extractibilité totale en pesant, après séchage, le résidu filtré ou le précipité centrifugé.

Il est également nécessaire de différencier au plan quantitatif les impuretés et les additifs, d'une part, et les espèces de faible masse moléculaire, d'autre part. Dans le cas d'une détermination par gravimétrie, il est important de réaliser un essai à blanc, c'est-à-dire sans utiliser la substance à tester, de manière à pouvoir tenir compte des résidus générés par la méthode expérimentale.

On peut déterminer de la même manière le comportement de dissolution - extraction des polymères dans l'eau à 37 °C à pH 2 et pH 9 tel que décrit pour l'expérience réalisée à 20 °C. Les valeurs de pH peuvent être obtenues par addition de tampons adéquats ou d'acides et de bases appropriés tels que l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, les hydroxydes de sodium et de potassium de qualité pour analyse ou l'ammoniac.

Il convient de mener un ou deux essais, suivant la méthode d'analyse utilisée. Lorsqu'on dispose de méthodes suffisamment spécifiques pour l'analyse directe du polymère en phase aqueuse, un essai tel que décrit plus haut devrait suffire. Mais quand ces méthodes n'existent pas et que la détermination du comportement de dissolution-extraction du polymère ne peut se faire que par une analyse indirecte, c'est-à-dire uniquement par la détermination de la teneur en carbone organique total (COT) de l'extrait aqueux, il est nécessaire de réaliser un essai supplémentaire. Celui-ci doit aussi être effectué en trois exemplaires, avec des échantillons de polymère dix fois plus petits et les mêmes quantités d'eau que celles qui ont été utilisées dans le premier essai.

## 1.5.4. Analyse

## 1.5.4.1. Essais réalisés sur des échantillons d'une seule taille

Il est possible que l'on dispose de méthodes permettant une analyse directe des polymères en phase aqueuse. Sinon, l'analyse indirecte des polymères dissous ou extraits peut aussi être envisagée. Pour ce faire, on détermine la teneur totale en parties solubles et on la corrige pour tenir compte des substances non polymériques.

L'analyse de l'extrait aqueux pour déterminer la teneur totale en espèces polymériques peut être réalisée; soit par une méthode suffisamment sensible, par ex.

- la détermination du COT par la digestion au persulfate ou au dichromate pour donner du CO<sub>2</sub>,
- suivie d'une estimation par IR ou d'une analyse chimique; la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou son équivalent en émission d'un plasma couplé par induction (PCI),
- dans le cas des polymères contenant du silicium ou un métal.

- l'absorption UV ou la spectrofluorimétrie pour les polymères arylés,
  - la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse pour les échantillons de faible masse moléculaire,
- soit par évaporation à sec, sous vide, de l'extrait aqueux, suivie d'une analyse du résidu par spectroscopie (IR, UV, etc.) ou par SAA-PCI.

Si une telle analyse de la phase aqueuse est impossible, l'extrait aqueux sera obtenu au moyen d'un solvant organique non miscible à l'eau (un hydrocarbure chloré, par exemple). Le solvant est alors évaporé et le résidu analysé, par ex. par IR, UV ou SAA-PCI, pour déterminer sa teneur en polymère notifié. Tous les constituants de ce résidu qui s'avèrent être des impuretés ou des additifs doivent être soustraits dans le but de déterminer le degré de dissolution - extraction du polymère lui-même.

Lorsque de telles substances sont présentes en quantités relativement importantes, il peut être nécessaire de soumettre le résidu à une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance ou en phase gazeuse, par exemple, afin de différencier ces impuretés des monomères et des dérivés des monomères présents, de telle sorte que la teneur réelle en ces dernières espèces puisse être déterminée.

Dans certains cas, une simple évaporation à sec du solvant organique, suivie de la pesée du résidu sec, peut suffire.

#### 1.5.4.2. Essais réalisés sur des échantillons de deux tailles différentes

La teneur en carbone organique total doit être déterminée pour tous les extraits aqueux.

Une détermination par gravimétrie est réalisée sur la partie non dissoute ou non extraite de l'échantillon. Si, après la centrifugation ou la filtration du contenu de chaque récipient, des résidus de polymère adhèrent encore à la paroi d'un récipient, il faut rincer ce dernier avec le filtrat jusqu'à ce qu'il ne comporte plus aucune trace visible de résidus. Après quoi, le filtrat est à nouveau filtré ou centrifugé. Les résidus déposés sur le filtre ou dans le tube de centrifugation sont séchés à 40 °C sous vide et pesés. On poursuit le séchage jusqu'à obtention d'une masse constante.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Essais réalisés sur des échantillons d'une seule taille

Les résultats obtenus pour chacun des trois flacons, ainsi que les valeurs moyennes, doivent être consignés et exprimés en unités de masse par volume de solution (généralement en mg/l) ou en unités de masse par masse d'échantillon de polymère (habituellement en mg/g). En outre, la perte de masse de l'échantillon (calculée en divisant la masse du soluté par la masse de l'échantillon initial) sera également mentionnée. Les écarts-types relatifs doivent être calculés. Les diverses valeurs seront consignées à la fois pour le produit total (polymère + principaux additifs, etc.) et pour le polymère seul (à savoir, après soustraction de la contribution relative à de tels additifs).

### 2.2. Essais réalisés sur des échantillons de deux tailles différentes

Les différentes concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux provenant des deux séries de trois expériences, ainsi que la valeur moyenne pour chaque série, doivent être consignées et exprimées en unités de masse par volume de solution (généralement en mgC/l), ainsi qu'en unités de masse par masse de l'échantillon initial (généralement en mgC/g).

S'il n'y a pas de différence entre les résultats correspondant aux rapports taille de l'échantillon/volume d'eau élevés et bas, cela peut indiquer que tous les constituants susceptibles d'être extraits l'ont effectivement été. Si tel est le cas, une analyse directe n'est, en principe, pas nécessaire.

Les différentes masses des résidus doivent être consignées et exprimées en pourcentage des masses initiales des échantillons. On calculera les valeurs moyennes pour chaque expérience. La différence entre 100 et le pourcentage obtenu représente le pourcentage de matières solubles et extractibles dans les échantillons de départ.

## 3. PROCES-VERBAL D'ESSAI

### 3.1. Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit comporter les renseignements suivants :

#### 3.1.1. Substance à tester

- renseignements disponibles sur la substance à tester (nature, additifs, impuretés, proportion d'espèces de faible masse moléculaire).

#### 3.1.2. Conditions expérimentales

- description des méthodes utilisées et des conditions expérimentales,
- description des méthodes d'analyse et de détection.

#### 3.1.3. Résultats

- résultats de solubilité - extractibilité en mg/l : toutes les valeurs et la valeur moyenne obtenues pour les essais d'extraction dans les différentes solutions, ventilées en polymères et impuretés, additifs, etc.,
- résultats de solubilité - extractibilité en mg/g de polymère,
- concentrations du carbone organique total dans les extraits aqueux, masse du soluté et pourcentages calculés, si on en fait la mesure,
- pH de chaque échantillon,
- informations sur les valeurs obtenues dans les essais à blanc,
- description des méthodes d'analyse et de détection,
- si nécessaire, mention de l'instabilité chimique de la substance à tester durant la procédure d'essai et durant la procédure d'analyse,
- toutes les informations importantes pour interpréter les résultats.

## 4. REFERENCES

(1) DIN 53733 (1976). Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 4 février 2000.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET

## ANNEXE IV

## C.13 BIOCONCENTRATION : ESSAI AVEC RENOUVELLEMENT CONTINU SUR LES POISSONS

## 1. METHODE

La présente méthode de bioconcentration reproduit les directives OECD TG 305 (1996).

## 1.1. Introduction

La présente méthode décrit une procédure de caractérisation du potentiel de bioconcentration dans le cas de poissons soumis à un renouvellement continu de certaines substances. Les régimes d'essais avec renouvellement continu seront très largement préférés, mais des régimes semi-statiques sont également acceptables dans la mesure où les critères de validité sont satisfaits.

La méthode donne toutes informations nécessaires à l'exécution de l'essai mais laisse les libertés indispensables à l'adaptation du concept expérimental aux conditions spécifiques de chaque laboratoire et n'impose pas strictement les caractéristiques des substances à tester. Elle convient particulièrement bien aux produits organiques stables dont les valeurs  $\log P_{ow}$  sont comprises entre 1,5 et 6,0 (1) mais reste applicable aux substances superlipophiles ( $\log P_{ow} > 6,0$ ). Pour ces dernières, l'estimation préalable du facteur de bioconcentration (BCF), parfois dénommé  $K_B$ , sera vraisemblablement supérieure à la valeur du facteur de bioconcentration à l'état stable ( $BCF_{SS}$ ) auquel on peut s'attendre dans une expérience de laboratoire. Les évaluations préliminaires du facteur de bioconcentration des produits organiques dont les valeurs  $\log P_{ow}$  vont jusqu'à 9,0 environ sont calculables à l'aide de l'équation de Bintein et al (2). Le potentiel de bioconcentration se caractérise par certains paramètres, dont la constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ), la constante de vitesse d'élimination ( $k_2$ ) et le  $BCF_{SS}$ .

Les substances d'essai radiomarquées peuvent faciliter l'analyse des échantillons d'eau et de poissons et peuvent aussi servir à définir s'il est souhaitable d'identifier et quantifier la dégradation. Si les résidus radioactifs totaux sont mesurés (par exemple par combustion ou solubilisation des tissus), le BCF est basé sur le composé d'origine, tous les métabolites retenus ainsi que le carbone assimilé. Les BCF basés sur les résidus radioactifs totaux ne peuvent donc pas être directement comparables à un BCF dérivé d'une analyse chimique particulière du composé d'origine seul.

On pourra mettre en œuvre des procédures d'assainissement dans les études radiomarquées pour déterminer le BCF sur la base du composé d'origine et les principaux métabolites seront déterminés si on le juge nécessaire. Il est possible aussi de combiner une étude du métabolisme du poisson avec une étude de bioconcentration par analyse et identification des résidus tissulaires.

## 1.2. Définitions et unités

*Bioconcentration/Bioaccumulation* : augmentation de la concentration de la substance à tester dans ou sur un organisme (des tissus spécifiques de celui-ci) par rapport à la concentration de cette substance dans le milieu ambiant.

*Facteur de bioconcentration (BCF ou  $K_B$ )* : à tout moment pendant la phase d'absorption de l'essai d'accumulation, concentration de la substance à tester dans/sur le poisson, ou des tissus déterminés de celui-ci, ( $C_f$  en  $\mu\text{g/g}$  (ppm)) divisée par la concentration de la substance chimique dans le milieu ambiant ( $C_w$  en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm)).

*Facteur de bioconcentration à l'état stable ( $BCF_{SS}$  ou  $K_B$ )* : il ne change pas notablement pendant un laps de temps prolongé, la concentration de la substance d'essai dans le milieu ambiant étant constante pendant cette même période.

*Plateau ou état stable* : sur la représentation graphique de la substance d'essai dans le poisson ( $C_p$ ) en fonction du temps, il est atteint lorsque la courbe devient parallèle à l'axe du temps et que trois analyses successives du  $C_f$  réalisées sur des échantillons prélevés à des intervalles de deux jours au moins restent dans une plage de 20 % les unes des autres, et qu'il n'y a pas de différences significatives entre les trois périodes d'échantillonnage. Lorsqu'on analyse des échantillons mis en commun, il faut procéder à quatre analyses successives au moins. Si les substances d'essais ont des caractéristiques d'absorption lentes, on optera de préférence pour des intervalles hebdomadaires.

*Facteurs de bioconcentration* : calculés directement à partir des constantes cinétiques ( $k_1/k_2$ ) on les appelle facteurs de concentration cinétique,  $BCF_k$ .

*Coefficient de partage octanol-eau ( $P_{ow}$ )* : rapport de la solubilité d'un produit chimique dans le n-octanol et dans l'eau, à l'équilibre (Méthode A.8), également désigné par  $K_{ow}$ . Le logarithme de  $P_{ow}$  indique le potentiel de bioconcentration d'un produit chimique par les organismes aquatiques.

*Phase d'exposition ou d'absorption* : temps pendant lequel les poissons sont exposés au produit chimique testé.

*Constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ )* : valeur numérique définissant la vitesse d'accroissement de la concentration dans la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques de celui-ci) lorsqu'il est exposé à ce produit chimique ( $k_1$  est exprimé en  $\text{jours}^{-1}$ ).

*Phase de post-exposition ou d'élimination (perte)* : à la suite du transfert des poissons d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu exempt de celle-ci, temps pendant lequel l'élimination (ou perte nette) de la substance par les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) est étudiée.

*Constante de vitesse d'élimination (perte) ( $k_2$ )* : valeur numérique définissant la vitesse de diminution de la concentration de la substance à tester dans les poissons de l'essai (ou les tissus spécifiques) à la suite de leur transfert d'un milieu contenant la substance à tester à un milieu qui en est exempt ( $k_2$  exprimé en  $\text{jours}^{-1}$ ).

## 1.3. Principe de la méthode d'essai

L'essai se décompose en deux phases : la phase d'exposition (absorption) et de post-exposition (élimination). Pendant la phase d'absorption, des groupes distincts de poissons d'une espèce sont exposés à au moins deux concentrations de la substance d'essai. Puis ils sont transférés dans un milieu exempt de cette substance, pour la phase d'élimination. Cette dernière est toujours nécessaire sauf lorsque l'absorption de la substance pendant la phase d'absorption a été insignifiante (par exemple si le BCF est inférieur à 10). La concentration de la substance à tester dans/sur le poisson (ou des tissus spécifiques) est suivie pendant les deux phases de l'essai. Outre les deux concentrations de l'essai, un groupe témoin de poissons est maintenu dans des conditions identiques hormis la substance à tester, qui est absente. Ceci pour établir les éventuelles relations entre les effets néfastes observés dans le test de bioconcentration et ce groupe témoin assorti, et déduire les concentrations de fond de la substance à tester.

La phase d'absorption dure 28 jours sauf s'il est démontré que l'équilibre a été atteint plus tôt. On peut prévoir la durée de la phase d'absorption et le temps nécessaire à l'obtention de l'état stable grâce à l'équation donnée à l'annexe 3. La période de dépuraction commence alors par le transfert des poissons dans un autre récipient propre contenant le même milieu, exempt cette fois de la substance à tester. Lorsque cela est possible, on calcule le facteur de bioconcentration de préférence à la fois en tant que rapport ( $BCF_{SS}$ ) de concentration des poissons ( $C_p$ ) et dans l'eau ( $C_w$ ) à l'état d'équilibre apparent et en tant que facteur de bioconcentration cinétique; et  $BCF_k$  en tant que rapport des constantes de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) et de dépuraction ( $k_2$ ), en supposant une cinétique de premier ordre. Si, à l'évidence, on n'entre pas dans une cinétique de premier ordre, des modèles plus complexes devront être mis en œuvre (annexe 5).

Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'absorption sera prolongée jusqu'à cet état stable, ou bien pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant; puis commence la phase d'élimination.

La constante de vitesse d'absorption, la constante de vitesse de dépuraction (perte) (ou les constantes, lorsque des modèles plus complexes entrent en jeu), le facteur de bioconcentration et, si possible, les limites de confiance de chacun de ces paramètres, sont calculés à partir du modèle décrivant le plus fidèlement les mesures de concentrations de la substance à tester dans les poissons et l'eau.

Le BCF est exprimé en fonction du poids frais total du poisson. Cependant, pour certaines études, des tissus ou organes spécifiques (par exemple muscles, foie) peuvent être utilisés si les poissons sont suffisamment gros ou s'il est possible d'en séparer les parties comestibles (filets) et non comestibles (viscères). La relation claire liant le potentiel de bioconcentration et la lipophilie pour de nombreuses substances organiques, entraîne une relation correspondante entre la teneur en lipides des poissons de l'essai et des bioconcentrations observées de ces substances. Donc, pour réduire cette source de variabilité dans les résultats des essais concernant les substances à forte lipophilie (c'est-à-dire ayant un  $\log P_{ow} > 3$ ), la bioconcentration devrait être exprimée en fonction de la masse corporelle totale, mais aussi de la teneur lipidique.

La teneur lipidique sera établie si possible sur les mêmes matériels biologiques qui auront servi à déterminer la concentration de la substance à tester.

#### 1.4. Informations sur la substance d'essai

Avant d'entreprendre l'essai de bioconcentration, les informations suivantes devront être réunies au sujet de la substance à tester :

- a) solubilité dans l'eau;
- b) coefficient de partage octanol-eau  $P_{ow}$ , (noté également  $K_{ow}$ , déterminé par une méthode HPLC en A.8);
- c) hydrolyse;
- d) caractéristiques de la phototransformation dans l'eau sous rayonnement solaire ou solaire artificiel et dans les conditions de rayonnement de l'essai de bioconcentration (3);
- e) tension superficielle (c'est-à-dire pour les substances dont le  $\log P_{ow}$  ne peut être établi);
- f) pression de vapeur;
- g) biodégradabilité dite « facile » (le cas échéant).

Il faudra aussi connaître la toxicité relative à l'espèce de poissons utilisée dans l'essai, de préférence la  $LC_{50}$  à l'asymptote (c'est-à-dire indépendante du temps). Il est indispensable de disposer d'une méthode analytique correcte, d'une exactitude, d'une précision et d'une sensibilité connues pour la quantification de la substance à tester dans les solutions d'essai et dans le matériel biologique, ainsi que d'informations précises sur la préparation et le stockage des échantillons. Il faut aussi connaître la limite de détection analytique de la substance à tester tant dans l'eau que dans les tissus des poissons. Si une substance à tester marquée au  $^{14}C$  est utilisée, le pourcentage de radioactivité associée aux impuretés devra être connu.

#### 1.5. Conditions de validité de l'essai

Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes devront être vérifiées :

- la variation de température est inférieure à  $\pm 2$  °C,
- la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60 % du niveau de saturation,
- la concentration de la substance à tester dans les enceintes est maintenue à  $\pm 20$  % de la moyenne des valeurs mesurées pendant la phase d'absorption,
- la mortalité et autres effets/maladies indésirables tant parmi les poissons témoins que chez ceux traités sont inférieures à 10 % à la fin de l'essai; lorsque l'essai est prolongé sur plusieurs semaines ou mois, la mortalité ou les autres effets indésirables dans les deux ensembles de poissons devront être inférieurs à 5 % par mois et ne pas excéder 30 % au total.

#### 1.6. Composés de référence

L'utilisation de composés de référence ayant un potentiel de bioconcentration connu pourra aider au contrôle de la procédure expérimentale, si nécessaire. On ne peut cependant encore recommander de substances spécifiques.

#### 1.7. Description de la méthode d'essai

##### 1.7.1. Appareillage

On prendra soin d'éviter les matériaux susceptibles de présenter un effet indésirable d'adsorption, de dissolution ou de lessivage sur les poissons, et ce pour toutes les pièces de l'équipement. Des réservoirs standards rectangulaires ou cylindriques, en matériaux chimiquement inertes et d'une capacité adaptée au régime de remplissage seront utilisés. On réduira au minimum l'usage de tuyaux en plastique souple. Les tubages en Téflon (R), acier inoxydable et/ou verre auront la préférence. L'expérience a montré que pour les substances présentant de forts coefficients d'adsorption, tels que les pyréthrinés de synthèse, le verre silanisé peut être nécessaire. Il faudra, dans ces cas-là, se débarrasser des équipements après usage.

### 1.7.2. Eau

On utilise généralement pour les essais une eau naturelle provenant d'une source non polluée et de qualité uniforme. L'eau de dilution doit être d'une qualité permettant la survie de l'espèce de poissons choisie, pour la durée des périodes d'acclimatation et d'essai, sans qu'apparaissent aucun comportement ni aspect anormaux. Dans l'idéal, il faudrait démontrer que les espèces soumises à l'essai peuvent survivre, grandir et se reproduire dans l'eau de dilution (par exemple en élevage de laboratoire ou par une étude de toxicité sur un cycle biologique). L'eau sera caractérisée au minimum selon son pH, sa dureté, ses matières solides totales, son carbone organique total et, de préférence aussi, ses teneurs ammoniacales, en nitrates et son alcalinité et, pour les espèces marines, sa salinité. On connaît parfaitement les paramètres importants du bien-être optimal chez les poissons, mais l'annexe 1 indique les concentrations maximales recommandées d'un certain nombre de paramètres concernant les eaux d'essais, douces et marines.

Pendant toute la durée d'un essai, l'eau sera d'une qualité constante. Le pH se tiendra entre 6,0 et 8,5, mais pour un essai donné il restera à l'intérieur d'une plage de  $\pm 0,5$  unité de pH. Pour s'assurer que l'eau de dilution n'influencera pas indûment les résultats de l'étude (par exemple par complexation de la substance à tester) ou n'affectera pas négativement les performances du stock de poissons, on prélèvera régulièrement des échantillons pour analyses. Il conviendra par exemple de procéder tous les trois mois, lorsqu'une eau de dilution est connue pour être relativement constante en qualité, à la détermination des métaux lourds (par exemple Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), des anions et cations principaux (par exemple Ca, Mg, Na, K, Cl,  $\text{SO}_4$ ), des pesticides (par exemple organophosphorés totaux et organochlorés totaux), du carbone organique total et des solides en suspension. S'il est démontré que la qualité de l'eau est contante pendant une année au moins, ces analyses pourront être moins fréquentes et leurs intervalles espacés (par exemple tous les six mois).

La teneur en particules naturelles ainsi que le carbone organique total (TOC) de l'eau de dilution seront aussi faibles que possible pour éviter l'adsorption de la substance à tester sur les matières organiques, qui pourrait réduire sa biodisponibilité (4). La valeur maximale admissible est de 5 mg/l pour les particules de matière (matière sèche ne traversant pas un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ ) et 2 mg/l pour le carbone organique total (voir annexe 1). Si nécessaire, l'eau sera filtrée avant usage. La contribution des poissons de l'expérience (excréta) et des résidus alimentaires, et la teneur de l'eau en carbone organique total devra être aussi faible que possible. Tout au long de l'essai, la concentration en carbone organique dans le récipient concerné ne devra pas dépasser de plus de 10 mg/l ( $\pm 20\%$ ) celle du carbone organique provenant de la substance à tester et, le cas échéant, de l'agent de dissolution.

### 1.7.3. Solutions d'essai

On prépare une solution stock de la substance à tester, à la concentration voulue. La solution stock sera de préférence préparée par simple mélange ou agitation de la substance à tester dans l'eau de dilution. L'utilisation de solvants ou de dispersants (agents de dissolution) n'est pas recommandée; on peut y recourir cependant dans certains cas pour produire une solution stock à la concentration nécessaire. Les solvants susceptibles d'être utilisés sont l'éthanol, le méthanol, l'éther monométhyle d'éthylène glycol, l'éther diméthyle d'éthylène glycol, le diméthylformamide et le triéthylène glycol. Les dispersants utilisables sont le Cremophor RH40, le Tween 80, la méthylcellulose à 0,01 % et le HCO-40. Des précautions seront prises en cas d'utilisation d'agents facilement biodégradables, ces derniers pouvant provoquer des problèmes de croissance bactérienne dans les tests avec renouvellement continu. La substance d'essai peut être radiomarquée et devra être du plus haut niveau de pureté (par ex. de préférence  $> 98\%$ ).

Pour les essais avec renouvellement continu, un appareillage apportera et diluera en permanence la solution stock de la substance à tester (par exemple pompe doseuse, dilueur proportionnel, système saturateur) pour amener les concentrations d'essai jusqu'aux enceintes. Il sera préférable de prévoir au moins cinq volumes de remplacement par jour pour chaque enceinte d'essai. Le mode avec renouvellement continu sera préféré, mais en cas d'impossibilité (par exemple les organismes de l'essai subissent des effets néfastes) une technique semistatique pourra être mise en œuvre si les critères de validité restent satisfaits. Les régimes d'écoulement des solutions stocks et de l'eau de dilution seront contrôlés 48 heures avant l'essai puis au moins quotidiennement pendant celui-ci. Ce contrôle comportera la détermination du débit dans chaque enceinte d'essai et l'on s'assurera qu'il ne s'écarte pas de plus de 20 % pour chacune d'elles ou bien entre elles et les autres.

### 1.7.4. Sélection des espèces

Parmi les critères importants de sélection des espèces figurent la facilité de se les procurer, leur taille, et la possibilité d'un entretien aisé en laboratoire. On sélectionnera aussi les espèces de poissons en fonction de leur importance en matière de loisirs, commerce ou écologie; ils doivent également être de sensibilités comparables, avoir produit de bons résultats dans le passé, etc.

On trouvera à l'annexe 2 une liste d'espèces recommandées pour les essais. D'autres espèces peuvent être utilisées mais la procédure d'essai peut devoir être adaptée pour établir des conditions expérimentales convenables. Dans un tel cas, on exposera les motivations du choix des espèces et la méthode expérimentale retenue.

### 1.7.5. Conservation des poissons

Il faut acclimater la population de poissons pendant deux semaines au moins dans une eau à la température de l'essai et apporter une quantité de nourriture suffisante et du même type que celle qui sera utilisée pendant l'essai.

Après une période d'installation de 48 heures, on enregistre les taux de mortalité et les critères suivants sont appliqués :

- mortalité supérieure à 10 % de la population en sept jours : rejeter le lot entier,
- mortalité entre 5 et 10 % de la population en sept jours : prolonger l'acclimatation pendant sept jours de plus,
- mortalité inférieure à 5 % de la population en sept jours : accepter le lot - si la mortalité dépasse 5 % pendant les sept jours suivants, rejeter le lot entier.

S'assurer que les poissons utilisés pour les essais ne présentent pas de maladies ni d'anomalies observables. Écarter tout poisson malade. Les poissons ne sont pas censés être traités contre une quelconque maladie pendant les deux semaines précédant l'essai, ni pendant celui-ci.

## 1.8. Exécution de l'essai

### 1.8.1. Essai préliminaire

Il peut être utile de procéder à une expérimentation préliminaire pour optimiser les conditions d'exécution de l'essai réel, en ce qui concerne par ex. la sélection de la/des concentration(s) de la substance à tester, la durée des phases d'absorption et d'élimination.



### 1.8.2. Conditions d'exposition

#### 1.8.2.1. Durée de la phase d'absorption

On peut prévoir la durée de la phase d'absorption en s'appuyant sur une expérience concrète (par ex. à partir d'une étude antérieure ou d'un produit chimique ayant des propriétés d'accumulation) ou à partir de certaines relations empiriques fondées sur ce que l'on sait de la solubilité dans l'eau ou bien du coefficient de partage octanol/eau de la substance à tester (voir annexe 3).

La phase d'absorption durera 28 jours sauf s'il peut être démontré qu'un équilibre a été atteint plus tôt. Si l'on ne parvient pas à un état stable dans les 28 jours, la phase d'équilibre sera prolongée et l'on procédera à d'autres mesures, jusqu'à état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant.

#### 1.8.2.2. Durée de la phase d'élimination

La moitié de la durée de la phase d'absorption convient généralement pour que se produise une réduction convenable (par exemple 95 %) de la charge corporelle en substance d'essai (voir explications de l'estimation à l'annexe 3). Si le temps nécessaire pour parvenir à une perte de 95 % est démesurément long, dépassant par exemple de deux fois la durée normale de la phase d'absorption (à savoir plus de 56 jours), on pourra en rester à une période plus courte (c'est-à-dire jusqu'à ce que la concentration de la substance à tester soit inférieure à 10 % de la concentration d'état stable). Cependant, pour les substances ayant des schémas d'absorption et d'élimination plus complexes que le modèle de poissons à compartiment unique, donnant une cinétique de premier ordre, on autorisera des phases de dépuración plus longues pour déterminer les constantes de vitesse d'élimination. Ce laps de temps peut néanmoins être régi par la période durant laquelle la concentration dans les poissons de la substance à tester demeure au-dessus de la limite de détection analytique.

#### 1.8.2.3. Nombre de poissons de l'essai

Choisir les nombres de poissons par concentrations d'essai de telle sorte qu'au minimum quatre poissons par échantillon seront disponibles à chaque échantillonnage. Si l'on souhaite une statistique plus fine, le nombre de poissons par échantillon devra augmenter.

Si on utilise des poissons adultes, indiquer s'ils sont mâles ou femelles ou si les deux sexes servent à l'expérience. Dans ce dernier cas, avant de commencer l'exposition, il faudra vérifier que les différences de teneurs lipidiques ne sont pas significatives; il pourra être nécessaire de faire des lots distincts de mâles et de femelles.

Tous les essais se feront avec un choix de poissons de poids similaires, de sorte que les plus petits ne soient pas inférieurs aux deux tiers du poids des plus gros. Ils appartiendront tous à la même classe d'âge et proviendront de la même source. Le poids et l'âge d'un poisson ayant apparemment parfois des effets notables sur les valeurs BCF (1), ces informations seront enregistrées avec précision. Il est souhaitable qu'un sous-échantillon de la population de poissons soit pesé avant l'essai, pour en estimer le poids moyen.

#### 1.8.2.4. Chargement

Les rapports eau/poissons seront élevés afin de minimiser la réduction du  $C_w$  due à l'ajout des poissons au début de l'essai, mais aussi pour éviter les diminutions de concentration en oxygène dissous. Il importe que le régime de chargement soit adapté à l'espèce utilisée pour l'essai. Un régime de chargement de 0,1-1,0 g de poisson (poids humide) par litre d'eau et par jour est recommandé en tout état de cause. On peut réaliser des chargements à hauts régimes s'il est démontré que la concentration voulue en substance à tester est maîtrisable dans des limites de  $\pm 20$  % et que la concentration d'oxygène dissous ne tombe pas au-dessous de 60 % du niveau de saturation.

On tiendra compte de l'habitat normal de l'espèce dans le choix du régime de chargement. Les poissons benthiques par exemple peuvent demander un aquarium ayant davantage de surface de fond que les espèces pélagiques, pour un même volume d'eau.

#### 1.8.2.5. Alimentation

Pendant les périodes d'alimentation et d'essai, les poissons sont nourris selon un régime approprié ayant des teneurs en lipides et protéines totales déterminées, en quantités suffisantes pour les maintenir en bonne santé et conserver leur poids corporel. Les poissons sont nourris quotidiennement pendant les périodes d'acclimatation et d'essai à raison d'environ 1 à 2 % de leur poids corporel chaque jour; on maintient ainsi pour la plupart des espèces une concentration lipidique d'un niveau relativement constant pendant l'essai. La quantité de nourriture devra être recalculée une fois par semaine par exemple, afin de maintenir un poids corporel et des teneurs lipidiques cohérents. Pour ce calcul, le poids des poissons de chaque enceinte d'essai sera estimé à partir du poids des poissons échantillonnés le plus récemment dans cette enceinte. Ne pas peser les poissons restant dans l'enceinte.

La nourriture non consommée et les excréments sont évacués par siphonnage quotidien des enceintes d'essai peu après le nourrissage (30 minutes à une heure). Les enceintes seront tenues aussi propres que possible tout au long de l'essai de sorte que la concentration de matière organique reste au plus bas niveau envisageable, car la présence de carbone organique peut limiter la biodisponibilité de la substance à tester. (1)

Nombre d'aliments étant des dérivés de farines de poissons, ils seront analysés pour déterminer leur teneur en substance d'essai. Il est préférable aussi d'analyser les teneurs de ces nourritures en pesticides et métaux lourds.

#### 1.8.2.6. Éclairage et température

La photopériode est généralement de 12 à 16 heures et la température ( $\pm 2$  °C) correspondra à l'espèce utilisée (voir annexe 2). Le type et les caractéristiques de l'éclairage seront nettement définis. Il faudra prendre garde aux phototransformations éventuelles de la substance à tester dans les conditions de rayonnement de l'étude. L'éclairage ne devra pas exposer les poissons à des photoproduits non naturels. Dans certains cas, il peut être essentiel d'utiliser un filtre pour bloquer les rayons UV inférieurs à 290 nm.

#### 1.8.2.7. Concentrations de l'essai

Les poissons sont exposés à un renouvellement continu de deux concentrations aqueuses au moins de la substance à tester. Normalement, la concentration haute (ou la plus haute) de la substance à tester sera d'environ 1 % de sa  $LC_{50}$  aiguë à l'asymptote, et au moins 10 fois supérieure à sa limite de détection dans l'eau par la méthode d'analyse retenue.

La plus forte concentration de l'essai peut aussi être établie en divisant la  $LC_{50}$  à 96 heures par un ratio approprié aigu/chronique (les ratios adéquats de certains produits chimiques peuvent aller de 3 à 100). Si possible, choisir l'autre (les autres) concentration(s) de sorte que la différence avec celle qui lui est supérieure atteigne un facteur dix. En cas d'impossibilité due au critère de 1 % de la  $LC_{50}$  et de la limite analytique, un facteur inférieur à dix pourra être utilisé ou bien on songera à l'intervention d'une substance radiomarquée du  $^{14}C$ . Aucune concentration mise en œuvre ne devrait dépasser la solubilité de la substance d'essai.

Lorsqu'un agent de dissolution est utilisé sa concentration ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et doit être identique dans tous les récipients de l'essai. Sa contribution, ajoutée à celle de la substance à tester, à la teneur globale en carbone organique dans l'eau de l'expérience doivent être connues. Tout sera néanmoins fait pour éviter le recours à ce type de matériels.

#### 1.8.2.8. Témoins

Une eau de dilution témoin ou, si nécessaire, un témoin contenant l'agent de dissolution sera disponible en marge de la série des tests, dans la mesure où il a été établi que l'agent n'a aucun effet sur les poissons. Dans le cas contraire, on mettra en place les deux témoins.

#### 1.8.3. Fréquence des mesures de la qualité de l'eau

Pendant l'essai, l'oxygène dissous, le TOC, le pH et la température seront mesurés dans tous les récipients. La dureté totale, et la salinité éventuellement, seront mesurées dans les témoins et un récipient contenant la concentration haute (la plus haute). Au minimum, l'oxygène dissous et éventuellement la salinité seront mesurés trois fois - au début, vers le milieu et à la fin de la période d'absorption - et une fois par semaine pendant la période d'élimination. Le TOC sera mesuré au début de l'essai (24 et 48 heures avant le démarrage de la phase d'absorption), avant l'ajout des poissons et au moins une fois par semaine pendant les périodes d'absorption et d'élimination. La température sera mesurée quotidiennement, le pH au début et à la fin de chaque période et la dureté une fois pour chaque essai. La température sera de préférence surveillée en continu dans un récipient au moins.

#### 1.8.4. Echantillonnage et analyse des poissons et de l'eau

##### 1.8.4.1. Calendrier d'échantillonnage des poissons et de l'eau

De l'eau sera prélevée dans les enceintes d'essai pour établir la concentration de la substance à tester avant l'ajout des poissons et pendant les phases d'absorption et de dépuración. Au minimum, l'eau est prélevée en même temps que les poissons et avant leur alimentation. Pendant la phase d'absorption, les concentrations de substance à tester sont déterminées pour vérifier qu'elles satisfont aux critères de validité.

Les poissons sont échantillonnés en cinq occasions au moins pendant la phase d'absorption et en quatre occasions au moins pendant la phase de dépuración. Il est parfois difficile de calculer une valeur estimative raisonnablement précise du BCF sur la base de ce nombre d'échantillons, en particulier lorsque l'on sort du cadre d'une simple cinétique de dépuración de premier ordre. Dans ce cas, on pourra alors échantillonner à des rythmes plus rapides dans les deux périodes (voir annexe 4). Les échantillons supplémentaires sont stockés et analysés uniquement si les résultats de la première série d'analyses se révèlent insuffisants au calcul du BCF avec la précision voulue.

On trouvera à l'annexe 4 un exemple de calendrier d'échantillonnage acceptable. D'autres peuvent être facilement établis sur la base d'autres valeurs supposées du  $P_{ow}$  pour calculer le temps d'exposition correspondant à une absorption de 95 %.

On poursuit l'échantillonnage pendant la phase d'absorption jusqu'à établissement d'un état stable ou pendant 28 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Si l'on ne parvient pas à un état stable en 28 jours, l'échantillonnage continue jusqu'à obtention d'un état stable ou pendant 60 jours, l'alternative la plus courte prévalant. Avant de commencer la phase d'élimination, les poissons sont transférés dans des réservoirs propres.

##### 1.8.4.2. Échantillonnage et préparation des échantillons

On prélève les échantillons d'eau destinés aux analyses, par exemple en siphonnant à l'aide d'un tube inerte un point central de l'enceinte d'essai. Puisqu'il semble que l'on ne peut séparer ni par centrifugation ni par filtration la fraction non biodisponible de la substance à tester de celle qui est biodisponible (en particulier dans le cas des produits chimiques super-lipophiles, c'est-à-dire ceux ayant un  $\log P_{ow} > 5$ ) (1) (5), on peut s'abstenir de soumettre les échantillons à ces traitements.

Par contre, il faudra veiller à ce que les réservoirs restent aussi propres que possible et à ce que la teneur en carbone organique total soit surveillée tout au long des phases d'absorption et d'élimination.

Un nombre convenable de poissons (normalement quatre au minimum) est prélevé dans chaque enceinte d'essai pour chaque échantillonnage. Les poissons prélevés sont rapidement rincés à l'eau, séchés avec un papier absorbant, et sacrifiés instantanément de la manière la plus humaine possible, puis pesés.

Il est préférable d'analyser les poissons et l'eau immédiatement après l'échantillonnage pour éviter toute dégradation ou autres pertes et pour calculer approximativement les régimes d'absorption et de dépuración pendant que l'essai se poursuit. L'analyse immédiate évite aussi de ne pas retarder le constat qu'un plateau a été atteint.

Faute d'une analyse immédiate, les échantillons sont conservés selon une méthode convenable. Avant le début de l'étude, on réunira toutes informations sur la méthode de stockage adéquate de cette substance à tester, par exemple congélation, maintien à 4 °C, durée du stockage, extraction, etc.

##### 1.8.4.3. Qualité de la méthode analytique

L'intégralité de la procédure étant régie principalement par l'exactitude, la précision et la sensibilité de la méthode analytique mise en œuvre pour la substance à tester, il faut contrôler expérimentalement que la précision et la reproductibilité de l'analyse chimique, ainsi que la récupération de la substance à tester tant dans l'eau que dans les poissons donnent toute satisfaction dans le cadre particulier de cette méthode. Vérifier aussi que la substance à tester n'est pas détectable dans l'eau de dilution utilisée.

Si nécessaire, les valeurs de  $C_w$  et  $C_f$  dérivées des essais seront corrigées au vu des valeurs fournies par les témoins et la concentration naturelle de la substance d'essai. Les échantillons de poissons et d'eau sont manipulés en permanence de manière à minimiser les pollutions et les pertes (résultant par exemple de l'absorption par le matériel d'échantillonnage).

#### 1.8.4.4. Analyse des poissons échantillonnés

Si l'on utilise pour l'essai des matériels radiomarqués, on peut analyser le marquage radioactif total (c.à.d. composés d'origine et métabolites) ou purifier les échantillons de sorte que le composé d'origine puisse être analysé séparément. En outre, les principaux métabolites peuvent être caractérisés soit à l'état stable soit à la fin de la phase d'absorption, l'alternative la plus courte prévalant. Si le BCF en termes de résidus radiomarqués totaux est  $\geq 1\ 000\ \%$ , il peut être conseillé (et, pour certaines catégories de produits chimiques tels que les pesticides, fortement recommandé), d'identifier et quantifier les produits de dégradation représentant  $\geq 10\ \%$  des résidus totaux dans les tissus des poissons à l'état stable. Si ces produits représentant  $\geq 10\ \%$  des résidus totaux radiomarqués dans les tissus de poissons sont identifiés et quantifiés, il est alors recommandé de les identifier et les quantifier aussi dans l'eau de l'essai.

La concentration de la substance à tester devrait généralement être déterminée pour chaque poisson pesé. Si cela n'est pas possible, on pourra mettre en commun les échantillons à chaque échantillonnage, mais cette mise en commun restreint véritablement les procédures statistiques dont les données pourraient bénéficier. Si une procédure et une finesse statistiques spécifiques sont souhaitées, il conviendra alors de faire participer à l'essai un nombre adéquat de poissons pour satisfaire à la procédure de regroupement et à la précision statistique désirées (6) (7).

Le BCF sera exprimé à la fois en fonction du poids frais total et, pour les substances fortement lipophiles, en fonction de la teneur lipidique. La teneur lipidique des poissons est établie si possible lors de chaque échantillonnage. Des méthodes bien adaptées seront utilisées pour déterminer la teneur en lipides (réf. 8 et 2 de l'annexe 3). On recommande les techniques d'extraction par chloroforme/méthanol comme méthode standard (9). Toutes les méthodes ne donnant pas des valeurs identiques (10), il importe de bien préciser celle utilisée. L'analyse des lipides sera si possible faite sur les mêmes extraits que ceux consacrés à l'analyse de la substance à tester, puisque les lipides doivent souvent être enlevés de l'extrait avant qu'on puisse l'analyser par chromatographie. La teneur lipidique des poissons (en mg/kg de poids frais) à la fin de l'expérience ne devrait pas s'écarter de celle du début de  $\pm 25\ \%$ . Le pourcentage de solides dans les tissus sera lui aussi indiqué pour permettre la conversion de la concentration lipidique de la base humide à la base sèche.

## 2. DONNEES

### 2.1. Traitement des résultats

La courbe d'absorption de la substance à tester résultera du tracé de sa concentration, en fonction du temps, dans/sur les poissons (ou des tissus spécifiques) pendant la phase d'absorption, sur une échelle arithmétique. Si la courbe a atteint un plateau, c'est-à-dire adopte approximativement un tracé asymptotique à l'axe du temps, l'état stable  $BCF_{SS}$  sera calculé comme suit :

$$\frac{C_f \text{ état stable (médian)}}{C_w \text{ état stable (médian)}}$$

Lorsqu'on ne parvient à aucun état stable, il reste possible de calculer un  $BCF_{SS}$  d'une précision suffisante pour l'évaluation des risques à partir d'un « état stable » à  $80\ \%$  ( $1,6/k_2$ ) ou  $95\ \%$  ( $3,0/k_2$ ) de l'équilibre.

En outre, le facteur de concentration ( $BCF_k$ ) sera défini comme le rapport  $k_1/k_2$ , des deux constantes cinétiques de premier ordre. La constante de vitesse d'élimination ( $k_2$ ) est généralement déterminée à partir de la courbe d'élimination (c.à.d. un tracé de la décroissance en fonction du temps de la concentration de la substance à tester dans le poisson). La constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) est alors calculée en fonction de  $k_2$  et d'une valeur de  $C_f$  dérivée de la courbe d'absorption (voir aussi annexe 5). La méthode de choix pour obtenir  $BCF_k$  et les constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_2$ , est de recourir à des méthodes informatiques non linéaires d'estimation des paramètres (11). On peut alternativement utiliser des méthodes graphiques pour calculer  $k_1$  et  $k_2$ . Si la courbe de dépuración est à l'évidence autre que de premier ordre, alors il conviendra d'utiliser des modèles plus complexes (voir références à l'annexe 3) et de demander conseil à un biostatisticien.

### 2.2. Interprétation des résultats

Les résultats seront interprétés avec précaution lorsque les concentrations de solution d'essai mesurées se trouvent à des niveaux proches de la limite de détection de la méthode d'analyse.

La clarté de définition des courbes d'absorption et d'élimination témoigne de la bonne qualité des données de bioconcentration. La variation des constantes absorption/élimination entre les deux concentrations d'essai doit être inférieure à  $20\ \%$ . Les différences notables observées dans les taux d'absorption/élimination entre les deux essais de concentration seront enregistrées et expliquées si possible. En général, la limite de confiance des BCF approche  $\pm 20\ \%$  dans les études bien conçues.

## 3. RAPPORT

Le procès-verbal d'essai doit comporter les informations suivantes :

### 3.1. Substance d'essai

- nature physique et, le cas échéant, propriétés physico-chimiques,
- données d'identification chimique (y compris la teneur en carbone organique, si besoin),
- en cas de marquage radioactif, position précise du/des atome(s) marqué(s) et pourcentage de radioactivité associée aux impuretés.

### 3.2. Espèces utilisées

- Dénomination scientifique, souche, source, tout traitement préalable éventuel, acclimatation, âge, gamme des tailles, etc.

### 3.3. Conditions de l'essai

- procédure mise en œuvre (par exemple renouvellement continu ou semi-statique),
- type et caractéristiques de l'éclairage utilisé et photopériode(s),
- concept de l'essai (par exemple nombre et taille des enceintes d'essai, régime de remplacement des volumes d'eau, nombre de sous-échantillons et de poissons par sous-échantillon, nombre de concentrations testées, durée des phases d'absorption et de dépuración, fréquence des échantillonnages pour les poissons et l'eau).

- méthode de préparation des solutions mères et fréquence de renouvellement (l'agent de dissolution, sa concentration et sa contribution à la teneur en carbone organique de l'eau de l'essai seront indiqués, le cas échéant),
- les concentrations d'essai nominales, les moyennes des valeurs mesurées et leurs écarts-types dans les récipients d'essai et leur méthode d'obtention,
- source de l'eau de dilution, description de tout traitement préalable, résultats de toute démonstration de l'aptitude des poissons utilisés à vivre dans cette eau et caractéristiques de celle-ci : pH, dureté, température, concentration en oxygène dissous, niveaux de chlore résiduel (si mesuré) carbone organique total, solides en suspension, salinité du milieu d'essai (le cas échéant) et toutes autres mesures réalisées,
- qualité de l'eau dans les récipients d'essai, pH, dureté, TOC, température et concentration en oxygène dissous,
- renseignements précis sur l'alimentation (par exemple type de nourriture, source, composition - au moins teneurs en lipides et protéines si possible, quantité donnée et fréquence),
- renseignements sur le traitement des poissons et de l'eau échantillonnés, y compris détails de préparation, stockage, extraction, procédures (et précision) de l'analyse de la substance à tester et teneur en lipides (si mesurée).

#### 3.4. Résultats

- résultats de toute étude préliminaire effectuée,
- mortalité des poissons témoins et des poissons dans chaque enceinte d'essai et tous comportements anormaux observés,
- teneur lipidique des poissons (si détermination à l'occasion de l'essai),
- courbes (dont toutes données mesurées) montrant l'absorption et l'élimination des produits chimiques de l'essai dans les poissons, le temps d'accès à l'état stable,
- $C_f$  et  $C_w$  (avec écart-type et plage, le cas échéant) au moment de chaque échantillonnage ( $C_f$  exprimé en  $\mu\text{g/g}$  de poids frais (ppm) de tout l'animal ou de certains de ses tissus, par exemple lipides et  $C_w$  en  $\mu\text{g/ml}$  (ppm). Valeurs  $C_w$  de la série témoin (indiquer aussi la concentration de fond),
- facteur de bioconcentration à l'état stable ( $\text{BCF}_{\text{SS}}$ ) et/ou facteur de concentration cinétique ( $\text{BCF}_k$ ) et, le cas échéant, limites de confiance à 95 % des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (perte) toutes exprimées par rapport au corps entier et de la teneur totale en lipide, si elle est mesurée, de l'animal (ou certains de ses tissus), limites de confiance et écart-type (si disponible), méthodes de calcul/analyse des données pour chaque concentration de substance d'essai utilisée,
- lorsqu'on utilise des substances radiomarquées, l'accumulation de tous les métabolites détectés pourra être signalée si cela est nécessaire,
- toute situation inhabituelle concernant l'essai, tout écart de ces procédures et toutes autres informations pertinentes.

Minimiser les résultats du type « non détecté à la limite de détection » par la mise en place d'une méthode d'essai préliminaire et l'élaboration d'un concept expérimental, car ces résultats sont inutilisables pour les calculs des constantes de vitesse.

#### 4. REFERENCES

- (1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp 117-156.
- (2) Bintein S., Devillers, J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, 29-390.
- (3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. *Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals No 3*.
- (4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish : Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. *Water Quality Institute, Denmark*.
- (5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- (6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- (7) US EPA (1974). Section 5, A(1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in *Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*, Thompson J.F. (ed.) Research Triangle Park, N.C. 27711.
- (8) Compaan H. (1980) in —)The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment : degradation, toxicity, bioaccumulation Ch. 2.3, Part II. Government Publishing Office, The Hague, The Netherlands.
- (9) Gardner et al, (1995) *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099-1105.
- (10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, pp 1431-1436.
- (11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish : the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors : P. Kristensen and N. Nyholm.
- (12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

## Annexe 1

## Caractéristiques chimiques acceptables pour l'eau de dilution

	Substance	Limite de concentration
1	Particules de matière	5 mg/l
2	Carbone organique total	2 mg/l
3	Ammoniaque non ionisé	1 µg/l
4	Chlore résiduel	10 µg/l
5	Pesticides organophosphorés totaux	50 ng/l
6	Pesticides organochlorés totaux plus polychlorobiphényles	50 ng/l
7	Chlore organique total	25 ng/l
8	Aluminium	1 µg/l
9	Arsenic	1 µg/l
10	Chrome	1 µg/l
11	Cobalt	1 µg/l
12	Cuivre	1 µg/l
13	Fer	1 µg/l
14	Plomb	1 µg/l
15	Nickel	1 µg/l
16	Zinc	1 µg/l
17	Cadmium	100 ng/l
18	Mercure	100 ng/l
19	Argent	100 ng/l

## Annexe 2

## Espèces de poissons recommandées pour les essais

	Espèces recommandées	Plages de températures recommandées pour les essais (°C)	Longueur totale recommandée des animaux utilisés (cm)
1	Danio rerio <sup>(1)</sup> ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Hamilton-Buchanan) Petit Danio	20-25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Rafinesque) Tête de boule	20-25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio ( <i>Teleostei, Cyprinidae</i> ) (Linnaeus) Carpe	20-25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Temminck and Schlegel)	20-25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata ( <i>Teleostei, Poeciliidae</i> ) (Peters) Guppy	20-25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus ( <i>Teleostei, Centrarchidae</i> ) (Rafinesque) Crapet arlequin	20-25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss ( <i>Teleostei, Salmonidae</i> ) (Walbaum) Truite de Kamloops	13-17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus ( <i>Teleostei, Gasterosteidae</i> ) (Linnaeus) Épineuse	18-20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993), Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

Diverses espèces d'estuaires et marines ont été utilisées dans certains pays par exemple :

Tambour croca	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Pétote	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Siouclet	<i>Menidia beryllina</i>
Perche-méné	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Carlottin anglais	<i>Parophrys vetulus</i>
Chabot	<i>Leptocottus armatus</i>
Épinoche épineuse	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Bar	<i>Dicentracus labrax</i>
Ablette	<i>Alburnus alburnus</i>

### Récolte

Les poissons d'eau douce énumérés dans le tableau ci-dessus sont faciles à élever et/ou largement disponibles tout au long de l'année, alors que la disponibilité des espèces marines ou d'estuaires est en partie limitée à certains pays. Ils peuvent se reproduire et vivre soit dans des fermes piscicoles soit en laboratoire, dans des conditions où les maladies et parasites sont sous contrôle; les animaux utilisés seront donc sains et de lignées connues. On les trouve à peu près partout dans le monde.

### Annexe 3

#### Prévision de la durée des phases d'absorption et d'élimination

##### 1. Prévision de la durée de la phase d'absorption

Avant d'exécuter l'essai, on pourra estimer  $k_2$  et donc un pourcentage du temps nécessaire pour parvenir à l'état stable, à partir de relations empiriques entre  $k_2$  et le coefficient de partage n-octanol/eau ( $P_{ow}$ ) ou  $k_2$  et la solubilité dans l'eau (s).

On estimera  $k_2$  (jour<sup>-1</sup>) à partir, par exemple, de la relation empirique suivante (1) :

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

Pour les autres relations, voir réf. (2).

Si le coefficient de partage ( $P_{ow}$ ) est inconnu, on procédera à une estimation (3) à partir de la solubilité dans l'eau (s) de la substance d'après :

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

où s = solubilité (moles/l) : (n = 36).

Ces relations ne s'appliquent qu'aux produits chimiques dont les valeurs  $\log P_{ow}$  se situent entre 2 et 6,5 (4).

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable résultera de l'équation cinétique générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre), par application du  $k_2$  estimé :

$$\frac{dC_i}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_i$$

où, si  $C_w$  est constant :

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

Lorsque l'on se rapproche de l'état stable ( $t \rightarrow \infty$ ), l'équation 3 se réduit (5) (6) à :

$$C_i = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{ou} \quad C_i/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}.$$

Le rapport  $k_1/k_2 \cdot C_w$  approche alors la concentration dans le poisson à « l'état stable » ( $C_{f,s}$ ).

L'équation 3 peut être ainsi transcrite :

$$C_i = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{ou} \quad \frac{C_i}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{équation 4}).$$

Le temps nécessaire pour atteindre un certain pourcentage de l'état stable peut être prévu grâce à l'équation 4 lorsque  $k_2$  est estimé au préalable à l'aide des équations 1 ou 2.

À titre indicatif, la durée optimale statistique de la phase d'absorption permettant d'obtenir des données statistiquement acceptables ( $\text{BCF}_k$ ) est la période nécessaire pour que la courbe du logarithme de la concentration de la substance à tester dans le poisson, portée en temps linéaire, parvienne à son point médian, soit à  $1,6/k_2$ , ou à 80 % de l'état stable, mais ne dépasse pas  $3,0/k_2$  ou 95 % de l'état stable (7).

Le temps d'accession à 80 % de l'état stable est (équation 4) :

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

De même, pour 95 % de l'état stable :

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

Par exemple, la durée de la phase d'absorption (abs.) d'une substance à tester ayant un  $\log P_{ow} = 4$  serait (avec les équations 1, 5 et 6) :

$$\log_{10} k_2 = -0,414(4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ jours}^{-1}$$

abs. (80 %) =  $1,6/0,652$ , c'est-à-dire 2,45 jours (59 heures)

ou abs. (95 %) =  $3,0/0,652$ , c'est-à-dire 4,60 jours (110 heures)

De même, pour une substance à tester avec  $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$  ( $\log(s) = -5,0$ ), la durée de l'absorption serait (avec les équations 1, 2, 5 et 6) :

$$\log_{10}(P_{ow}) = -0,862(-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414(5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ jours}^{-1}$$

abs. (80 %) =  $1,6/0,246$ , c'est-à-dire 6,5 jours (156 heures)

ou abs. (95 %) =  $3,0/0,246$ , c'est-à-dire 12,2 jours (293 heures).

On utilisera aussi, à titre d'alternative, l'expression :

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

pour calculer le temps d'accession effective à l'état stable (4).

## 2. Prévision de la durée de la phase d'élimination

On pourra également prévoir le temps nécessaire pour que la charge corporelle se réduise à un certain pourcentage de la concentration initiale grâce à l'équation générale illustrant l'absorption et l'élimination (cinétique de premier ordre) (1) (8).

Pour la phase d'élimination,  $C_w$  est supposé nul. L'équation peut être réduite à :

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{ou} \quad C_f = C_{f_0} e^{-k_2 t}$$

où  $C_{f_0}$  est la concentration au début de la période d'élimination. On parviendra ensuite à une élimination de 50 % à l'instant ( $t_{50}$ ) :

$$\frac{C_f}{C_{f_0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{ou} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

De même, 95 % d'élimination seront atteints à :

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

Si l'on se place à 80 % de l'absorption pour la première période ( $1,6/k_2$ ) et 95 % de perte dans la phase d'élimination ( $3,0/k_2$ ), alors la phase d'élimination est approximativement le double de la durée de la phase d'absorption.

Il importe cependant de noter que ces estimations sont fondées sur l'hypothèse que les schémas d'absorption et d'élimination suivent une cinétique de premier ordre. Si l'on n'est pas, à l'évidence, dans ce cadre, des modèles plus complexes devront être employés [par exemple réf (1)].

## Bibliographie (de l'annexe 3)

- (1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp 309-320.
- (2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish : comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- (3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp 4-10.
- (4) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22 (6), pp 701-707.
- (5) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) Transactions of the American Fisheries Society, 104 (4), pp 785-792.
- (6) Ernst W. (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In : Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- (7) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, Can. J. Chem. Eng. 55, pp 614-622.
- (8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish : Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere. 9, pp 3-19.

## Annexe 4

**Exemples théoriques de calendriers d'échantillonnage pour les tests de bioconcentration  
des substances ayant un  $\log P_{ow} = 4$**

Prélèvements de poissons	Calendrier d'échantillonnage		Nombre d'échantillons d'eau	Nombre de poissons par échantillon
	Fréquence mini- male requise (jours)	Echantillonnage supplémentaire		
<b>Phase d'absorption</b>	- 1 0		2 (*) 2	<b>ajouter 45-80 poissons</b>
1e	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2e	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3e	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4e	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5e	4,7		2	6
<b>Phase de dépurat</b>				<b>Transférer les poissons dans une eau exempte du produit à tester</b>
6e	5,0	5,3		4 (4)
7e	5,9	7,0		4 (4)
8e	9,3	11,2		4 (4)
9e	14,0	17,5		6 (4)

(\*) Prélever l'eau après apport de 3 « volumes d'enceintes » au moins.

Les valeurs entre parenthèses sont les nombres d'échantillons (eau, poissons) à prélever si l'on procède à un échantillonnage supplémentaire.

*Note* : L'estimation avant essai de  $k_2$  pour un  $\log P_{ow}$  de 4,0 est de  $0,652 \text{ jour}^{-1}$ . La durée totale de l'expérience est fixée à :

3 x abs. = 3 x 4,6 jours, soit 14 jours. Se reporter à l'annexe 3 pour l'estimation de l'« absorption ».



## Annexe 5

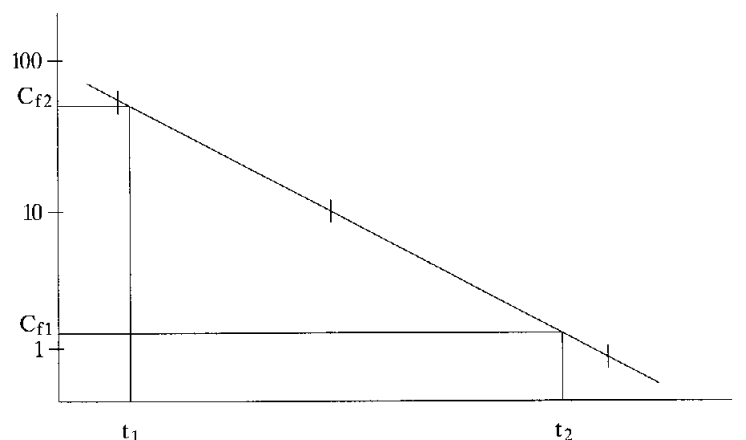
**Discrimination des modèles**

On suppose que la plupart des données de bioconcentration sont « raisonnablement » bien décrites par un modèle simple à deux compartiments/deux paramètres, selon la courbe rectiligne qui reprend approximativement les points de mesure des concentrations dans les poissons pendant la phase d'élimination, sur papier semilogarithmique. (Lorsque ces points ne peuvent se ramener à une droite, il convient de recourir à des modèles plus complexes, voir par exemple Spacie and Hamelink, réf. 1 à l'annexe 3.)

**Méthode graphique de détermination de la constante de vitesse d'élimination (perte)  $k_2$** 

Porter sur du papier semilogarithmique la concentration de la substance à tester trouvée dans chaque échantillon de poisson, selon le calendrier d'échantillonnage. La pente de cette droite est  $k_2$ .

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



Attention : les écarts par rapport à cette ligne droite peuvent indiquer un schéma d'élimination plus complexe qu'une cinétique de premier ordre. Une méthode graphique peut résoudre des types d'élimination s'écartant de la cinétique de premier ordre.

**Méthode graphique de détermination de la constante de vitesse d'absorption  $k_1$** 

$k_2$  étant établi, on calcule  $k_1$  comme suit :

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

On lit la valeur de  $C_f$  au point médian de la courbe d'absorption lissée produite par les données lorsque la concentration logarithmique est portée en fonction du temps (sur une échelle arithmétique).

**Méthode de calcul informatique des constantes de vitesse d'absorption et d'élimination (perte)**

Pour obtenir le facteur de bioconcentration et les constantes de vitesse  $k_1$  et  $k_2$  on utilisera de préférence des méthodes informatiques non linéaires d'estimation paramétriques. Ces programmes établissent les valeurs de  $k_1$  et  $k_2$  en fonction d'un ensemble de données séquentielles de concentration dans le temps et du modèle :

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

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

où  $t_c$  = temps à la fin de la phase d'absorption.

Cette démarche débouche sur des estimations de l'écart-type pour  $k_1$  et  $k_2$ .

Puisqu'on peut dans la plupart des cas estimer  $k_2$  à partir de la courbe d'élimination et ce avec une précision relativement grande, et puisqu'il existe une forte corrélation entre les deux paramètres  $k_1$  et  $k_2$ , il peut être souhaitable de calculer d'abord  $k_2$  à partir des données d'élimination uniquement, puis de calculer  $k_1$  à partir des données d'absorption à l'aide d'une régression non linéaire.

Vu pour être annexé à Notre arrêté du 4 février 2000.

ALBERT

Par le Roi :

La Ministre de la Protection de la consommation,  
de la Santé publique et de l'Environnement,

Mme M. AELVOET