

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

STABILITÉ DE DISPERSION DES NANOMATERIAUX EN MILIEU ENVIRONNEMENTAL SIMULÉ

INTRODUCTION

1. Avec l'essor de la production et de l'utilisation de nanomatériaux manufacturés, la probabilité devrait augmenter de retrouver ces matériaux dans les systèmes naturels, où leur transport et leur distribution dans l'environnement passe notamment par les milieux aqueux. Il convenait donc d'examiner si les protocoles d'essai réglementaires existants sont suffisants et adéquats pour l'évaluation du devenir des nanomatériaux manufacturés et de leur impact sur le ou les systèmes naturels considérés. La stabilité de dispersion des nanomatériaux a été identifiée comme un paramètre important influant sur leur comportement environnemental. Ce paramètre dépend des caractéristiques physicochimiques du nanomatériau lui-même, des caractéristiques physicochimiques du milieu de suspension, de la préparation de la suspension, de la concentration du nanomatériau, ainsi que de la concentration d'autres substances et particules dans la suspension. La stabilité de dispersion est en outre extrêmement dynamique dans bien des cas, car elle obéit à un contrôle cinétique (barrières énergétiques) plutôt qu'à un régime d'équilibre thermodynamique. Des données sur la stabilité de dispersion et le comportement d'agglomération des nanomatériaux sont donc indispensables – au même titre que leur vitesse de dissolution, par exemple – pour la conduite d'autres essais robustes et fiables sur les nanomatériaux.

2. La présente ligne directrice pour les essais de produits chimiques décrit une méthode d'essai permettant d'obtenir des données sur la stabilité de dispersion des nanomatériaux manufacturés en milieu environnemental simulé. Ses résultats permettent de classer les nanomatériaux soumis à l'essai en trois

classes selon leur stabilité de dispersion dans les milieux aqueux testés. Cette classification distingue les nanomatériaux ayant une stabilité de dispersion faible ou une stabilité de dispersion élevée dans les conditions étudiées, et les nanomatériaux dont la stabilité de dispersion est dépendante des conditions. Afin de reproduire les conditions environnementales naturelles, la ligne directrice prescrit de réaliser l'essai sous différentes conditions hydrochimiques représentatives de la composition de nombreuses eaux douces pour ce qui est des caractéristiques influant sur la stabilité, en faisant varier des paramètres tels que le pH, la force ionique et la présence de matière organique naturelle dissoute (MON/MOD). Les données sur la stabilité de dispersion sont importantes pour l'évaluation du devenir des nanomatériaux dans l'environnement aquatique, et peuvent aider à prédire leur comportement dans les essais écotoxicologiques.

3. La présente ligne directrice fournit un instrument simple et efficace d'analyse de la stabilité de dispersion en milieux aqueux dans des conditions représentatives de la chimie des eaux de surface naturelles pour ce qui est de leurs composantes influant sur la stabilité. Les essais seront réalisés dans le but d'étudier le devenir des nanomatériaux dans les eaux naturelles, leur comportement potentiel dans les milieux d'essai et leur impact sur l'environnement d'après les critères énumérés ci-dessus.

4. Pour les définitions et les unités, on se reportera à l'Annexe 1.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES ET LIMITES

5. *Données de base et objet de la présente ligne directrice* – Cette ligne directrice a principalement pour objet l'évaluation de la capacité d'un nanomatériau à former une dispersion colloïdale et à conserver cet état de dispersion dans des conditions similaires à celles de l'environnement. La méthode d'essai comporte la dispersion du nanomatériau par une procédure de sonication calibrée, et la détermination de la concentration massique du nanomatériau dans une série de récipients d'essai au cours du processus d'homoagglomération et de sédimentation des particules dans des environnements présentant différentes caractéristiques hydrochimiques. La méthode d'essai vise à établir si un nanomatériau peut être dispersé dans des conditions hydrochimiques données et dans quelle mesure il reste dispersé dans le temps. La stabilité de dispersion sera déterminée en pourcentage, à l'issue d'une période de 6 h ou en fonction du temps, selon le cas. L'essai se déroule dans des conditions opérationnelles définies et permet de comparer des matériaux entre eux. Cela signifie qu'il ne fournit pas de paramètres quantitatifs tels que des vitesses d'agglomération, des tailles de particules en fonction du temps ou des efficacités d'attachement. De plus, la méthode d'essai est conçue pour être simple et pouvoir être appliquée en conditions normales de laboratoire. Cette démarche a été conçue sur une proposition de von der Kammer (1) et affinée par l'équipe d'Ottofuelling (2), qui en a vérifié la pertinence environnementale. La méthode repose sur la construction d'une matrice d'essai multidimensionnelle comprenant les paramètres d'essai représentatifs de l'environnement dont l'influence sur la stabilité de dispersion des nanomatériaux est prédominante. Ces paramètres, qui incluent la présence de divers cations et anions des eaux naturelles, la matière organique naturelle (MON) et le pH, sont représentatifs des combinaisons de paramètres que l'on retrouve dans 90-95 % des eaux douces naturelles. La démarche utilisée dans cette ligne directrice constitue donc une méthode plus universelle et plus simple que la conduite d'essais sur tous les types d'eaux douces (importants) et la prise en compte de toutes les éventualités (variations saisonnières, notamment). Les fondements théoriques de la démarche et les critères de choix des milieux et des paramètres à prendre en

compte en raison de leur influence sur la dispersibilité et la stabilité de dispersion sont présentés aux paragraphes 6-16.

6. *Stabilité d'une dispersion aqueuse* – Dans une dispersion aqueuse, les particules sont soumises à un mouvement brownien se traduisant par des collisions entre particules. Si elles adhèrent les unes aux autres lors de ces collisions, elles forment des agglomérats. Alors que pour les petites particules, la sédimentation dans le milieu aqueux est contrecarrée par le déplacement brownien, et la vitesse de sédimentation nette est négligeable, les agglomérats formés finissent par atteindre des tailles de particules pour lesquelles la vitesse de sédimentation est supérieure au déplacement brownien, ce qui entraîne la sédimentation des particules : la dispersion n'est pas stable dans le temps. La taille de particule pour laquelle la sédimentation devient le processus dominant dépend de la densité et de la forme des particules primaires, de la taille, de la structure et de la densité réelle des agglomérats et de la température. Notons que certains de ces paramètres ne seront pas caractérisés par une valeur (une taille) unique et fixe, mais par une distribution de valeurs (de tailles). Du fait des collisions entre particules, les dispersions de particules solides sont intrinsèquement instables et les particules finissent par s'agglomérer. Toutefois, une barrière énergétique résultant de la combinaison des diverses forces d'interaction entre les particules peut empêcher les particules de s'attacher entre elles et donc empêcher ou ralentir le processus d'agglomération. Parmi les diverses forces s'exerçant entre les particules, trois forces principales de nature différente régissent les interactions des particules. Ce sont l'interaction de Van der Waals (le plus souvent attractive, de courte portée), les interactions électrostatiques (attractives ou répulsives) et les forces stériques émanant de macromolécules liées à la surface (répulsives ou attractives). Dans les dispersions aqueuses, la force d'interaction résultante entre les particules est déterminée principalement par la composition des particules, la chimie de surface et l'hydrochimie. Une dispersion stable est créée si les forces d'interaction résultantes sont répulsives et ne peuvent pas être surmontées par la quantité de mouvement des particules qui s'approchent, il s'agit donc d'une situation de non-équilibre cinétiquement empêchée d'atteindre l'équilibre à l'état aggloméré.

7. *Sélection des paramètres du milieu* – L'objectif de l'essai étant d'évaluer le comportement des nanomatériaux dans des conditions similaires aux conditions naturelles, le choix de la composition du milieu environnemental simulé est crucial pour la pertinence de l'essai. Le milieu doit représenter les eaux de surface naturelles, et le choix des différents paramètres et de leurs plages de valeurs doit être fondé sur (i) la capacité du paramètre à influencer sur la stabilité colloïdale et (ii) la probabilité que le paramètre présente un niveau tel, dans les eaux naturelles, qu'il ait un impact important sur la stabilité colloïdale. Ainsi, le sodium en tant que cation monovalent n'influe généralement sur la stabilité colloïdale des dispersions qu'à une concentration rarement observée dans les eaux douces naturelles. En revanche, il est probable que le calcium, dont l'effet sur la stabilité colloïdale est supérieur de plus d'un ordre de grandeur en raison de son caractère divalent, soit souvent présent à des concentrations telles qu'il influe sur la stabilité colloïdale. Le pH influe sur la charge de surface (et donc sur le potentiel zêta) de nombreux nanomatériaux. La MON a un effet relatif universel de stabilisation des dispersions contre l'agglomération, qui dépend toutefois du type de nanomatériau et de son revêtement, de la concentration et du type de MON et de l'hydrochimie. Les paramètres clés pour le milieu d'essai sont donc le pH, la concentration d'ions divalents et de MON. Ils sont mis en œuvre à des concentrations représentatives de 90-95 % des eaux de surface naturelles (selon la base de données FOREGS (3)). $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ a été choisi comme électrolyte majeur en raison de l'effet dominant des cations multivalents (Ca^{2+}) sur l'agrégation des particules, par comparaison avec les ions monovalents, moins efficaces, et les ions trivalents, moins abondants, ainsi qu'en raison de sa présence à des concentrations relativement élevées.

8. *Milieu alternatif* – Les paramètres décrits ci-dessus sont les composantes du milieu qui influent sur la stabilité. Ils simulent de façon adéquate les conditions naturelles pour des particules qui sont chargées négativement, dans les conditions de l'essai, et interagissent avec la MON. Dans ce cas, les ions calcium représentent pratiquement la somme totale des cations divalents dans les eaux naturelles, et les différences mineures dues à la présence de magnésium peuvent être négligées. Lorsque la surface des particules est chargée positivement, le nitrate dans le milieu d'essai primaire est moins efficace, en tant qu'anion monovalent, que ne le serait le sulfate pour déstabiliser la dispersion. Un milieu plus réaliste, mais plus complexe, ferait donc également intervenir le magnésium et le sulfate, qui sont tous deux présents dans les eaux naturelles à des plages de concentrations de nature à agir sur la stabilité. Le magnésium est moins efficacement complexé par la MON, dans une situation où celle-ci n'est pas adsorbée à la surface du nanomatériau testé, la complexation du cation divalent par la MON (se traduisant par une réduction de son activité ionique) est un important mécanisme de stabilisation. Mg^{2+} étant complexé dans une moindre mesure que Ca^{2+} , un milieu d'essai contenant du calcium et du magnésium représenterait mieux la situation naturelle. Il a été observé que l'adsorption de sulfate sur les nanoparticules de TiO_2 accroît le potentiel zêta négatif, mais déstabilise en même temps considérablement la dispersion (4). Pour un essai alternatif complémentaire avec un milieu plus réaliste, il est donc possible d'utiliser les rapports entre sels suivants. Les rapports entre concentrations molaires dans le milieu alternatif devraient être proches des rapports moyens observés dans la nature : Ca^{2+}/Mg^{2+} 4:1, nitrate/sulfate 10:1. Ces rapports peuvent être obtenus très facilement (mais pas exactement) en utilisant les sels $Ca(NO_3)_2$ et $MgSO_4$ pour préparer un milieu présentant un rapport molaire Ca^{2+}/Mg^{2+} de 4:1. L'essai de stabilité de dispersion dans le milieu alternatif n'a pas fait partie de l'étude de validation sous-tendant la présente ligne directrice.

9. La force ionique (F_I) est une mesure de la concentration de tous les ions dans une solution. Elle est calculée comme suit :

$$FI = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

où c est la concentration molaire de l'ion i et z la valence de cet ion, les anions et les cations étant également pris en compte. La force ionique est directement liée à l'épaisseur de la double couche électrique. En présence d'un électrolyte dans un milieu aqueux, une double couche électrique se forme autour des particules. Cette double couche est la région proche de la surface des particules où le potentiel électrique de la surface est équilibré par les contre-ions présents dans la solution. Plus la concentration d'électrolyte et la valence des ions sont élevées, plus est faible la distance, depuis la surface de la particule, à laquelle le potentiel s'annule. L'interaction électrostatique est l'une des nombreuses forces qui régissent la stabilité de la dispersion. Pour des particules ayant une charge de surface de même polarité, une faible concentration d'électrolyte favorise la stabilité, alors qu'une concentration élevée d'électrolyte favorise l'agglomération et la sédimentation. Une double couche électrique compacte et mince (en présence d'une concentration élevée d'électrolyte) permet aux particules de s'approcher plus près les unes des autres et d'interagir plus efficacement sous l'effet des forces d'attraction de Van der Waals, de courte portée. Si l'on considère des particules ayant une charge de surface opposée, une faible concentration d'électrolyte accélère l'agglomération et la sédimentation des particules. Dans ce cas, une double couche électrique plus épaisse favorise le rapprochement des particules et des interactions plus rapides entre elles sous l'effet des forces d'attraction électrostatique.

10. *pH* – Le pH a un effet sur la charge de surface de particules portant des charges variables, qui peuvent être protonées ou déprotonées en surface. Ces charges variables peuvent avoir pour origine la surface minérale ou des revêtements de surface organiques ionisables. Une modification du pH peut alors modifier le niveau et la polarité de la charge de surface. Les dispersions de particules qui sont stabilisées de façon principalement électrostatique sont particulièrement instables lorsque le pH est égal au point de charge nulle (PCN). À ce pH, la charge nette à la surface de la particule formant la double couche électrique est nulle, ce qui diminue la répulsion électrostatique. Compte tenu de l'adsorption spécifique d'ions déterminant le potentiel (à savoir les ions calcium, carbonate) ou de molécules de MON provenant de la solution d'essai à la surface des particules, le PCN ne doit pas être égal au point isoélectrique (PIE) des particules dans le milieu d'essai.

11. *Concentration de matière organique dissoute (MOD)* La MOD, qui est la fraction $< 0.45 \mu\text{m}$ de la MON, influe sur la stabilité des dispersions de particules par adsorption à la surface des particules. Une charge de surface positive peut être inversée en charge négative du fait de l'adsorption de MOD, qui a généralement un caractère anionique ; des surfaces non chargées ou à charge négative peuvent acquérir un potentiel négatif (accru) contribuant à une plus grande stabilité. Les dispersions de particules deviennent généralement plus stables sous l'effet de ce type d'interactions. Cependant, lorsque la MOD adsorbée réduit ou simplement équilibre une charge positive à la surface des particules, une agglomération peut être observée. Les molécules de MOD dans la phase liquide ont en outre un effet tampon, maintenant le pH de la dispersion de particules à un niveau constant, et la MOD complexe les cations, ce qui réduit par exemple l'activité du calcium dans le milieu et donc l'effet déstabilisant du calcium.

12. *Concentration de particules* – Pour les dispersions de particules, la concentration de particules est souvent donnée en concentration massique de particules par volume de liquide de dispersion. Toutefois, ce n'est pas la concentration massique mais la concentration numérique de particules qui est le facteur clé pour le nombre de collisions entre particules par unité de temps dans une dispersion, et qui détermine donc le taux d'agglomération et par conséquent la vitesse à laquelle progressent l'agglomération et le transfert de phase. Afin d'obtenir des résultats comparables à partir de nanomatériaux présentant une taille de particules différente, dans le temps imparti à l'expérimentation, une plage de concentrations numériques de particules est définie (0.5×10^{12} à 5×10^{12} particules/l), et doit être respectée lors de la préparation des dispersions d'essai. Les concentrations numériques de particules sont liées aux concentrations massiques par le biais de la densité et de la taille des particules (ainsi que de la géométrie des particules).

13. *Nature des particules et chimie de surface* – Les surfaces des divers nanomatériaux présentent des groupes fonctionnels terminaux qui déterminent la chimie de surface des nanomatériaux dans la dispersion. La densité de surface et le type de groupes présents en surface déterminent dans quelle mesure les particules sont à même de développer une charge de surface et de constituer une double couche électrique dans un milieu aqueux. La charge permanente, acquise par substitution isomorphe, et la charge variable, dépendante du pH, sont deux facteurs majeurs à prendre en compte. De plus, les molécules (revêtements) liées à la surface peuvent introduire un facteur de stabilité non électrostatique, la stabilisation stérique, dans laquelle les molécules empêchent l'attachement des particules en créant une barrière stérique. Lorsque les particules interagissent avec les composants de la phase aqueuse (à savoir les ions et la MON), leur chimie de surface est modifiée par rapport à leur état initial. La charge de surface change et le PIE n'est plus identique au PCN. Les molécules de MON adsorbées peuvent remplacer ou recouvrir le revêtement technique éventuel des particules, ce qui modifie également leur chimie de surface et peut ajouter une composante de stabilisation stérique.

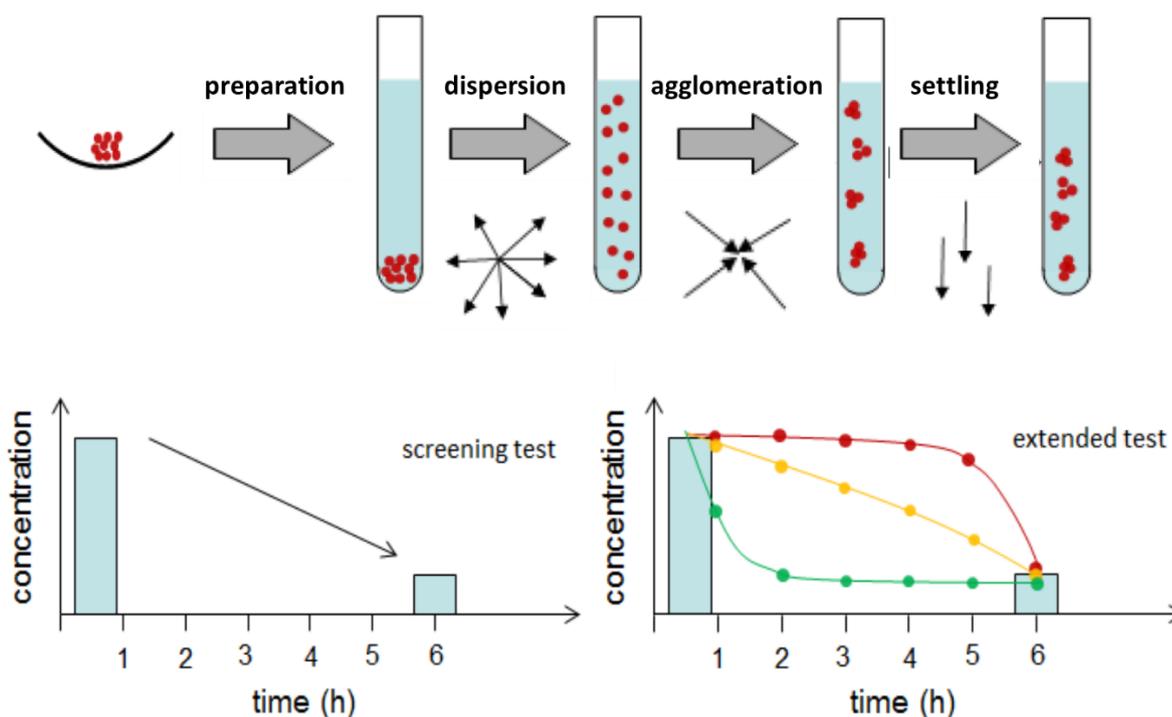
14. *Taille des particules et densité des particules* – Les particules < 100 nm dans un milieu aqueux subissent un mouvement brownien rapide et ont de faibles vitesses de sédimentation. Lorsque le mouvement brownien compense la sédimentation, les particules restent en dispersion tant qu'elles ne s'agglomèrent pas. Leur différence de densité par rapport à l'eau joue naturellement un rôle (voir le paragraphe suivant). Les grosses particules sédimentent plus vite que les petites particules de même densité. La taille des particules ayant plus d'effet que leur densité sur la sédimentation des particules, l'agglomération se traduit par une sédimentation plus rapide des particules, même lorsque la densité apparente de l'agglomérat devient inférieure à la densité des particules dont il est formé. Plus la taille d'une particule ou d'un agglomérat est élevée, plus la sédimentation est rapide et l'effet du mouvement brownien s'atténue, une séparation de phases se produit, et la dispersion n'est plus stable. En règle générale, la sédimentation l'emporte sur le mouvement brownien entre 100 nm et 1 µm, selon la densité des particules ou la densité réelle des agglomérats. En outre, il se peut que les particules de densité proche de celle de l'eau s'agglomèrent mais ne sédimentent pas sur la durée de l'essai, à savoir 6 h. Cela est pris en compte dans l'étape finale de centrifugation, qui fait intervenir la densité du matériau (mais pas la densité réelle des agglomérats, trop difficile à établir) et la taille des particules, avec un seuil de coupure de 1 µm. Les particules de densité élevée (nanoparticules d'or, par exemple) ont des vitesses de sédimentation considérables, même sous forme non agrégée (ainsi, les nanoparticules d'or de 100 nm sédimentent à 4.3 mm/jour à 20 °C).

15. *Limites de la présente ligne directrice* – Cette ligne directrice est applicable aux nanomatériaux de densité > 1 kg/l. La différence de densité des particules par rapport au milieu de dispersion et leur taille (masse flottante) sont les principaux facteurs influant sur leur vitesse de sédimentation, en particulier au stade de la centrifugation des échantillons. Les nanomatériaux de densité inférieure à 1 kg/l (dendrimères, polymères, etc.) ne sédimentent pas, quelle que soit leur taille, et peuvent même s'accumuler à l'interface air/eau des récipients. Pour ces nanomatériaux, il convient d'appliquer des méthodes ne reposant pas sur la sédimentation, mais par exemple sur l'augmentation dans le temps de la taille des particules, mesurée dans un dispositif à diffusion dynamique de la lumière (DLS). Ces méthodes n'entrent pas dans le champ de la présente ligne directrice.

16. Il est recommandé de consulter le document OCDE [*ENV/JM/MONO\(2012\)40 Guide sur la préparation d'échantillons et la dosimétrie pour les essais sur la sécurité des nanomatériaux manufacturés*](#), pour des informations complémentaires sur la caractérisation physicochimique des nanomatériaux.

PRINCIPE DE L'ESSAI

17. Les essais sont conçus comme une procédure de dispersion – agglomération – sédimentation dans des tubes à centrifugeuse de 50 ml, au cours de laquelle la séparation de phase résultant de l'agglomération et de la sédimentation des particules est évaluée par mesure(s) de la concentration de particules dans la partie supérieure du surnageant (figure 1).



Légendes de la figure :

En haut : préparation dispersion agglomération sédimentation

En bas : screening test : essai de dépistage - extended test : essai étendu - time (h) : temps (h)

Figure 1 : Principe du schéma expérimental (en haut) et résultat possible de l'essai de dépistage et de l'essai étendu (en bas ; voir le texte et la figure 2). La courbe rouge représente un nanomatériau dont la différence de densité avec l'eau est faible, il s'agglomère mais ne sédimente presque pas. À l'étape 6, il est procédé à une centrifugation qui tient compte de la fraction déposée du nanomatériau et opère une coupure en fonction de la taille des particules. Les agglomérats légers sont alors éliminés dans le sédiment car leur taille est supérieure au seuil de coupure. La courbe jaune représente un nanomatériau qui s'agglomère et sédimente de façon continue. La courbe verte représente soit un nanomatériau qui s'agglomère et sédimente rapidement (haute densité), soit un nanomatériau hétérogène comportant deux fractions différentes. Dans le premier cas, la concentration numérique en partie haute du tube est réduite de telle sorte que l'agglomération est ensuite ralentie au point de devenir pratiquement stable (trop peu de collisions dans le temps d'essai restant). Dans le second cas, une fraction est instable et sédimentée au bout de 2 h, une autre fraction est extrêmement stable et ne s'agglomère pas.

18. La matrice des conditions hydrochimiques étudiées lors de l'expérimentation couvre les conditions environnementales influant sur l'agglomération des nanomatériaux dans les eaux naturelles, à savoir le pH, la concentration d'électrolyte ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) et la matière organique naturelle dissoute. Pour vérifier la stabilité de dispersion dans les échantillons préparés pour l'essai, on estime l'agglomération et la sédimentation résultante des nanomatériaux par détermination de la concentration résiduelle de particules dans la couche supérieure, de 0,5-1 cm, de la dispersion. Avant la détermination à h 6 (après 6 heures d'essai), les échantillons sont en outre soumis à une centrifugation. Pour qu'une dispersion soit parfaitement stable, la concentration de particules dans le haut du tube (couche de 0,5-1 cm) ne doit pas changer dans le temps, tandis qu'en cas d'agglomération et (par conséquent) de sédimentation, la concentration de particules dans le volume supérieur de l'échantillon diminue progressivement. Les pertes possibles de matériau pendant les procédures de dispersion et de préparation des tubes pour l'essai sont évaluées par calcul du rapport entre la concentration de matériau mesurée à h 0 et la valeur de la

concentration attendue d'après la masse de matériau dispersée, et doivent être consignées (exprimées en %). La valeur à h 0 est définie comme la valeur à 100 % pour la suite des calculs et la représentation graphique, les pertes lors de la préparation de la dispersion et de l'établissement des conditions hydrochimiques dans les tubes étant alors négligées.

19. La méthode d'essai est scindée en deux parties (voir la figure 2). Un essai de dépistage relativement rapide (première partie), couvrant une plage de concentrations d'électrolyte, de pH et de MON, ne donne lieu qu'à deux mesures de concentration dans le surnageant : au début (h 0) et après 6 h plus une étape de centrifugation ayant pour seuil de coupure une taille de particules de 1 μm (outil de calcul à télécharger). La MON contribue à la stabilité du pH grâce à son pouvoir tampon intrinsèque, et favorise la stabilité de la dispersion. Cet essai peut donc être considéré comme un scénario réunissant des conditions optimales, pour la stabilité de dispersion des nanomatériaux en milieu aqueux (bien que toutes les particules ne soient pas nécessairement sujettes à une stabilisation par la MON contre l'agglomération). Si le nanomatériau ne présente pas une stabilité de dispersion faible ($\leq 10\%$) ou une stabilité de dispersion élevée ($\geq 90\%$), respectivement, dans toutes les conditions de l'essai, un essai étendu doit être réalisé, dans lequel un sous-échantillon est prélevé pour analyse toutes les heures pendant la période d'essai de 6 h (0-6 heures). L'essai étendu (deuxième partie) est réalisé dans la plage de conditions prescrite, en présence et en l'absence de MON. Afin d'empêcher les changements de pH dans les dispersions pratiquement non tamponnées en l'absence de MON, du bicarbonate de sodium est ajouté comme tampon à 5 mM, ce composé étant présent dans toutes les eaux naturelles aux pH testés.

20. L'addition d'une solution de MON aux échantillons répond à un double objectif. Le premier est de reproduire la stabilité de dispersion accrue liée à l'adsorption de molécules de MON à la surface des particules, ce qui simule l'interaction des nanomatériaux avec la MON présente dans les eaux naturelles. Cette stabilisation tient principalement aux effets électrostatique et stérique des groupes carboxyliques déprotonés, chargés négativement, présents dans la MON, effets liés à l'augmentation de la charge négative à la surface des particules (stabilité résultant d'une répulsion -/-). Dans le cas où la surface des particules est chargée positivement (stabilité résultant d'une répulsion +/+), l'addition de MON réduit tout d'abord la charge positive à la surface des particules, réduisant ainsi la stabilité des particules. Si une trop petite quantité de MON est ajoutée, l'inversion de charge (+/+ \rightarrow -/-) n'est pas atteinte, ou n'est pas suffisante pour rétablir la stabilité et l'addition de MON provoquera une instabilité de dispersion des particules. Cela peut être évité par la mise en œuvre d'une concentration minimale de MON, qui dépend (pour simplifier) de la surface spécifique des particules. Le second objectif est d'utiliser la MON comme tampon du pH de la dispersion, à pH élevé, contre l'effet d'absorption du CO_2 de l'air, sans avoir à recourir à d'autres additifs tampons qui pourraient influencer sur la stabilité de la dispersion. La MON interagit en outre avec les ions calcium par complexation ; la stabilité accrue des particules tient donc aussi à une réduction d'activité des ions calcium.

21. Un facteur important pour la comparabilité des résultats entre différents nanomatériaux est une concentration en nombre de particules standardisée au début de l'essai. La concentration numérique de particules détermine directement la vitesse du processus d'agglomération et de sédimentation. L'essai permet de suivre ce processus à des intervalles de temps prédéfinis. Si des concentrations massiques identiques sont utilisées pour des particules de taille et de densité différentes, les résultats à des points dans le temps prédéfinis varieront du simple fait des concentrations numériques différentes au début de l'essai. L'effet des concentrations en nombre de particules sur le résultat de l'essai a été étudié d'après l'exemple du TiO_2 (NM-105 (4)). Il est apparu que l'essai est insensible à la concentration numérique sur une plage d'environ un ordre de grandeur. La concentration numérique moyenne doit être calculée à partir de la densité des particules et d'une mesure appropriée de la taille des particules, fournie de préférence par des

essais physicochimiques du nanomatériau considéré. Le choix de la méthode adéquate de mesure de la taille des particules sera fondé sur une connaissance des caractéristiques des particules étudiées permettant d'atteindre la précision requise dans le calcul de la concentration numérique. Si ces données ne sont pas disponibles, une analyse par DLS selon la norme ISO 22412:2008 de la dispersion mère préparée pour l'essai est recommandée. La présente ligne directrice est applicable à des dispersions dont la concentration de particules est de l'ordre de 10^{12} particules/l ($\pm 1/2$ ordre de grandeur, ce qui définit la précision requise pour l'analyse de la taille des particules). Le nombre de particules dans la dispersion peut être calculé selon la formule suivante :

$$N = \frac{M}{\rho \times V}$$

où N est le nombre de particules dans la dispersion, M est la masse de poudre utilisée pour préparer la dispersion, ρ (kg/m^3) est la densité du matériau constitutif des particules (valeur connue), V (m^3) est le volume des particules, issu de données existantes sur le matériau ou calculé à partir de mesures de taille par DLS. Pour ce dernier, utiliser la formule applicable pour le volume d'une sphère et le premier mode (diamètre le plus fréquent) de la distribution pondérée en intensité de la fonction d'autocorrélation, et non la taille moyenne Z^1 . Un outil Microsoft® Excel fourni sur le site de l'OCDE pour la préparation de l'essai permet de calculer la concentration numérique de particules à partir des concentrations massiques, sur la base du modèle d'une sphère solide homogène ayant la densité et le diamètre moyen des particules du matériau.

22. L'Annexe 2B décrit le schéma expérimental et présente les résultats généralement obtenus pour les nanoparticules de TiO_2 (NM-105) et Ag (NM-300K(5)), fournis à des fins de comparaison.

¹ La **taille moyenne Z** est la taille moyenne hydrodynamique pondérée en intensité de l'ensemble des particules mesurées par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Essai de dépistage sur la stabilité de disp. (2 temps de mesure)					Matériau testé									
					Protocole de pesage – mouillage - dispersion									
					Matrice d'essai avec MON									
					Ca(NO ₃) ₂ en mM	0	1	10						
					pH									
					4	3x	3x	3x						
Essai étendu sur la stabilité de disp. (7 temps de mesure)	Non dispersible dans toutes les conditions d'essai					Quantités différentes de matériau restant dans la dispersion après 6 h d'expérimentation				Dispersible dans toutes les conditions				
						Protocole de pesage – mouillage - dispersion								
						Matrice d'essai avec MON					Matrice d'essai sans MON (+ NaHCO₃)			
						Ca(NO ₃) ₂ en mM	0	1	10		Ca (NO ₃) ₂ en pH			
						pH					4	3x	3x	3x
						4	3x	3x	3x		7	3x	3x	3x
				7	3x	3x	3x	9	3x	3x	3x			
				9	3x	3x	3x							

stabilité de dispersion faible	stabilité de dispersion intermédiaire		stabilité de dispersion élevée
≤ 10 %	intermédiaire basse 10 % < x < 50 %	intermédiaire haute 50 % < x < 90 %	≥ 90 %
	testée avec MON et sans MON	tendances de la séparation de phases	informations sur les caractéristiques de la séparation

Figure 2. Arbre décisionnel pour l'essai de détermination par étapes de la stabilité de dispersion. Pour les nanomatériaux qui n'ont pas une stabilité de dispersion élevée ou faible, respectivement, dans toutes les conditions lors de l'essai de dépistage, l'essai étendu doit être réalisé. L'essai étendu fournira en outre des informations sur l'évolution dans le temps de la sédimentation et donc sur le processus de sédimentation sous-jacent. Les concentrations de Ca(NO₃)₂ de la figure sont indiquées en mmol/l.

INFORMATIONS SUR LE MATÉRIAU TESTÉ

23. Pour la validité de l'essai et de l'interprétation des résultats, il convient de disposer de données sur la composition des nanomatériaux, leur densité, la taille des particules et leur surface spécifique, le PIE et la (vitesse de) dissolution, avant la conduite de l'essai ; ces données doivent figurer dans le rapport d'essai, avec les résultats. La densité et la taille des particules permettent de calculer la masse d'échantillon nécessaire, lors de l'essai, pour obtenir la concentration numérique de particules souhaitée. Des données sur ces paramètres physicochimiques sont en outre nécessaires pour déterminer si le nanomatériau étudié satisfait aux critères de validité de l'essai (paragraphe 25-27).

NANOMATÉRIAUX RECOMMANDÉS POUR LA VALIDATION DE L'ESSAI

24. Trois nanomatériaux de l'inventaire des nanomatériaux du Centre commun de recherche (JRC) ont été utilisés pour établir l'applicabilité de la démarche expérimentale proposée. Les trois nanomatériaux suivants peuvent être utilisés comme témoins pour la validation de routine de la présente ligne directrice, en tant que matériaux représentatifs de stabilités de dispersion spécifiques dans les conditions de l'essai : Ag (NM-300K) (5), un matériau parfaitement stable dans le temps et en toutes conditions, des nanotubes de carbone (NM-400) (6), instables dans toutes les conditions d'essai, et TiO₂ (NM-105) (4), qui présente une stabilité intermédiaire dépendante des conditions d'essai (voir aussi l'Annexe 2B). Il est recommandé de réaliser l'essai avec ces nanomatériaux au moins une fois, si l'on ne possède aucune expérience soit du système d'essai, soit des particules étudiées.

CONSIDÉRATIONS RELATIVES À L'APPLICABILITÉ DU TEST

25. Indépendamment de la réduction de la concentration de particules dans le surnageant par agglomération suivie de sédimentation des nanomatériaux dispersés, des écarts par rapport à la concentration initiale attendue peuvent être dus aux facteurs suivants :

- (a) Dispersion incomplète du nanomatériau analysé
- (b) Sédimentation rapide des particules de grande taille présentes dans le nanomatériau analysé
- (c) Attachement/adhésion des nanomatériaux aux parois des tubes utilisés pour l'expérience

26. Alors que (a) et (b) ne sont pas considérés comme des critères d'échec de l'essai, car l'essai rendra correctement compte de la stabilité de dispersion de la totalité du nanomatériau testé, (c) n'est pas lié à la stabilité de dispersion. De ce fait, les pertes par adhésion aux parois des tubes doivent être

déterminées et signalées dans le rapport. Ces pertes peuvent être identifiées par examen visuel et par une analyse du volume total de la dispersion, y compris des précipités éventuels, après l'essai, afin d'établir la quantité de nanomatériau dans le liquide. Un bilan massique révélera alors les pertes par adsorption sur les parois. Ces pertes doivent être évitées dans la mesure du possible. L'utilisation de tubes en un matériau différent (verre, polycarbonate, Téflon) au lieu des tubes pour centrifugeuse en polypropylène spécifiés pour l'essai peut aider à réduire ces pertes. Ce changement de tubes sera mentionné dans le rapport.

27. Si le nanomatériau testé présente un très fort taux de dissolution (cette information peut être disponible parmi les données établies selon la ligne directrice sur les essais de dissolution), la présente ligne directrice donnera un faux positif, les ions libérés restant dans le surnageant. En pareil cas, l'échantillon prélevé dans le surnageant doit être analysé de deux façons différentes : (1) détermination de la teneur en nanomatériau total et (2) détermination de la teneur en nanomatériau dissous, après filtration à travers un filtre à pores de petite taille. La filtration sur des membranes ayant pour seuil de coupure un poids moléculaire de 10.000 g/mol (daltons) dans des unités de filtration centrifuge de 15 ml peut être utilisée. Le seuil de coupure de la membrane équivaut approximativement à une taille de particule de 2 – 3 nm. La chambre de décharge du filtrat sera pré-chargée avec 50 µl d'acide nitrique 6M, afin de prévenir les pertes d'ions sur les parois du récipient. Ce volume doit être pris en compte lors du calcul de la concentration d'ions. La quantité d'ions dissous doit être consignée dans le rapport.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage et réactifs chimiques

28. Équipement normal de laboratoire, comprenant notamment :

- (a) Pipettes calibrées pour la préparation des échantillons (volumes de 5 ml, 2 ml, 0.1 ml)
- (b) Sonde à ultrasons de ½" ou 13 mm de diamètre (procéder au réglage de la puissance), pour la production de la dispersion de particules
- (c) pH-mètre équipé d'une microélectrode de 3 mm de diamètre pour la mesure du pH de la dispersion
- (d) Dispositif DLS pour la mesure de la taille des particules, en l'absence de données de caractérisation physicochimique disponibles
- (e) Bécher en verre de 250 ml pour la préparation de la dispersion mère
- (f) Récipient en verre ambré pour le stockage de la dispersion mère, ou récipient en polypropylène entouré d'une feuille d'aluminium protégeant de la lumière
- (g) Tubes en polypropylène de 50 ml, à fond conique (tubes de centrifugation de 50 ml à fond conique, 3 cm de diamètre, 11.5 cm de hauteur) pour la réalisation des tests d'agglomération
- (h) Tubes en polypropylène de 10 ml environ pour la préparation des échantillons en vue de l'analyse par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif ou par spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (selon la technique requise par l'auto-échantillonneur de l'instrument)
- (i) Centrifugeuse standard de laboratoire pouvant atteindre une force centrifuge relative (FCR) > 3000
- (j) Appareil de spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif ou de spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif pour l'analyse des dispersions de nanoparticules

29. Produits et réactifs :

- (a) Eau (H₂O) – de l'eau ultra pure désionisée (18 MΩ de résistivité) est utilisée pour toutes les préparations et dilutions
- (b) Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) – solution 0.1 M pour l'ajustement du pH
- (c) Acide nitrique (HNO₃) – solution 0.1 M pour l'ajustement du pH
- (d) MON : solution de matière organique naturelle (valeur cible 1 g/l de COD, valeur précise à déterminer par mesure du COD)
- (e) Nitrate de calcium (Ca(NO₃)₂) – solution 0.1 M pour l'établissement des différentes concentrations d'électrolyte
- (f) Solution de NaHCO₃ à une concentration de 0.1 M
- (g) Nanomatériau analysé, sous forme de poudre sèche ou de dispersion aqueuse

Conditions générales

30. Toutes les expériences sont réalisées en triplicats, dans des conditions proches des conditions normales (298.15 K (25 °C, 77 °F), 101.3 kPa (14.7 psi, 1.00 atm et 1.013 bar)).

Préparation de la dispersion mère de nanoparticules

31. Dans le cas où le nanomatériau testé est fourni sous forme de poudre sèche, il doit être pré-mouillé à l'eau ultra pure et laissé reposer sous forme de pâte humide pendant 24 h afin de permettre une interaction appropriée de la surface du nanomatériau avec l'eau ultra pure. Après 24 h de pré-mouillage, la pâte humide obtenue est dispersée dans un volume connu d'eau ultra pure, ce qui fournit une dispersion mère dont la concentration de nanomatériau est connue. La concentration de la dispersion mère devra être suffisante pour qu'il soit possible de la diluer encore jusqu'à la concentration numérique de particules souhaitée (0.5 x 10¹² à 5 x 10¹² particules/l) dans les échantillons analysés. La concentration massique de nanomatériau dans la dispersion mère ne doit pas être trop élevée, ce qui favoriserait l'agglomération du nanomatériau dans la solution mère avant dilution dans les tubes à essai. La concentration de nanomatériau recommandée dans la dispersion mère ne dépassera pas 20 fois la concentration de nanomatériau dans les échantillons analysés. L'utilisation d'une sonde de sonication calibrée² est obligatoire. Les sondes de sonication sont un matériel courant et il est relativement facile de calibrer l'énergie introduite dans la dispersion. Un outil Microsoft® Excel pour la préparation de l'essai, fournissant une aide au calcul de l'énergie de sonication délivrée par la sonde, est disponible sur le site de l'OCDE. La sonication de la dispersion sera réalisée comme suit :

- (a) Placer un bécher de verre de 250 ml dans un bain de glace > 1 l et sécuriser sa position afin d'éviter tout déplacement.
- (b) Ajouter 125 ml d'eau ultra pure et la quantité requise de nanomatériau.
- (c) Placer l'extrémité de la sonde à ultrasons (diamètre de ½" ou 13 mm) au centre du bécher, 2.5 cm sous la surface.
- (d) Appliquer une puissance de 40 W pendant 10 min.
- (e) Stocker la dispersion ainsi préparée dans un récipient en verre ambré à 4 °C (ne pas congeler !).

² La procédure de calibration de la sonde de sonication est décrite à l'Annexe 2A

32. La sonication des nanomatériaux présentant un rapport d'aspect (longueur/diamètre) élevé sera réalisée avec précaution, car ils tendent à se casser sous l'effet d'un apport élevé d'énergie. S'il y a lieu, la sonication de ces nanomatériaux se fera par une méthode permettant une dispersion aussi poussée que possible tout en évitant la destruction du nanomatériau étudié. Des techniques de dispersion appropriées, telles que la sonication en bain, sont décrites dans la littérature. Notons toutefois que les sonicateurs à bain sont difficiles à calibrer et présentent l'inconvénient d'une distribution non uniforme de l'énergie ultrasonique dans le bain. Parmi d'autres techniques, la sonication en bain se fait à travers les parois du récipient d'essai, qui ont un effet d'atténuation par absorption d'une quantité indéterminée de l'énergie de sonication.

33. Dans le cas où les nanomatériaux étudiés sont fournis sous forme de dispersion mère stable, celle-ci est diluée directement à la concentration voulue pour la préparation des échantillons. La sonication n'est pas nécessaire dans ce cas.

34. La dispersion mère non diluée ne doit pas être stockée pendant plus de 14 jours, et au-delà de 3 h, une re-dispersion au moyen d'une sonde de sonication doit être pratiquée conformément au § 28 (c) et (d) (mais en plaçant la sonde de sonication dans le flacon de suspension mère).

Préparation de la solution mère de MON

35. Avant d'observer la stabilité de dispersion en présence de MON, on préparera une solution mère de MON convenablement caractérisée et purifiée (bien nettoyée des ions et cendres), dont la teneur en COD sera déterminée. La composition chimique sera consignée. La MON 2R101N du fleuve Suwannee (SRMON) (8) est recommandée à titre d'exemple comme matériau standardisé et purifié utilisable à cette fin (tableaux 5 et 6, Annexe 2B). La solution mère de MON est préparée par addition de la quantité requise de poudre de MON à de l'eau ultra pure. Après ajustement du pH à 8 afin d'accélérer la dissolution, la solution de MON est maintenue sous agitation énergique ou placée sur un brasseur pendant 24 h. Le pH est ensuite mesuré et ajusté à 8 s'il y a lieu au moyen d'une solution à 1 M de HNO_3 ou de NaOH . La solution est filtrée au moyen d'un système de filtration sous vide constitué d'une pompe à vide et d'un filtre polyéther-sulfone (PES) stérile de 0.2 μm pour flacon. La teneur en COD de la solution de MON est alors établie (par exemple selon la norme ISO CEN EN 1484). La solution de MON est maintenue à 4 °C dans des flacons de verre ambré afin d'éviter l'exposition à la lumière. Le vieillissement de la MON entraînant une précipitation, il est recommandé de ne pas stocker la solution de MON au-delà de 4 semaines.

Stabilité de dispersion en présence d'électrolyte à différents pH dans les dispersions, avec et sans MON

36. Conformément à la démarche par étapes présentée à la figure 2, il est possible de réaliser dans un premier temps un essai de dépistage. Celui-ci couvre neuf situations différentes, avec une variation du pH et de la force ionique en présence de MON (voir aussi la figure 3 pour le schéma expérimental). Le programme d'analyse est limité à deux échantillonnages, le premier à h 0 et le second après h 6 et la centrifugation ayant pour seuil de coupure une taille de particules de 1 μm compte tenu de la densité du nanomatériau. Le schéma expérimental de l'essai étendu est mis en œuvre en l'absence et en présence de MON, en appliquant là encore neuf conditions différentes de pH et de concentration de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, et impose un échantillonnage toutes les heures jusqu'à h 6 suivie de l'étape de centrifugation décrite ci-dessus. Il n'est pas nécessaire de procéder à l'essai étendu si le nanomatériau présente une stabilité de dispersion soit faible soit élevée dans toutes les conditions expérimentales, lors de l'essai de dépistage (voir la figure 2).

37. Des aliquotes de la dispersion mère soniquée (paragraphe 31-34) sont transférées dans des tubes en polypropylène de 50 ml et diluées à l'eau ultra pure jusqu'à un volume de 20 ml. La dilution de la dispersion du matériau testé est réalisée de façon à limiter autant que possible le contact des particules en suspension avec la solution concentrée de MON ou le tampon et l'électrolyte ajoutés aux étapes suivantes (voir le schéma expérimental de la figure 3).

38. Si l'essai est réalisé en présence de MON, la quantité nécessaire de solution mère de MON (paragraphe 35) est ajoutée aux échantillons de façon à obtenir la concentration voulue de COD. En règle générale, la concentration de COD dans le volume d'essai final de 40 ml sera de 10 mg/l. En principe, le choix d'une concentration massique de MON n'est pas simple, car pour exercer un effet de stabilisation uniforme sur des nanomatériaux présentant des tailles de particules et, donc, des surfaces spécifiques différentes, la MON ajoutée aux échantillons doit être en rapport avec la surface des nanomatériaux dans les tubes. La concentration minimale de COD requise sera donc déterminée par la surface (S) du nanomatériau dans l'échantillon, calculée comme suit :

$$S=C_{\epsilon} \times V_{\epsilon} \times SS$$

où C_{ϵ} est la concentration de l'échantillon (en g/l), V_{ϵ} le volume de l'échantillon (en l) et SS la surface spécifique du nanomatériau (en m^2/g), établie par exemple par la méthode BET. Alors qu'une concentration de COD de 10 mg/l a été jugée suffisante pour le TiO_2 (NM-105), cela ne sera pas nécessairement le cas pour des nanomatériaux de surface spécifique plus élevée. L'hypothèse retenue ici est que 1 molécule de MOD par nm^2 sur toute la surface du nanomatériau analysé serait le minimum requis. La concentration minimale de COD recommandée est de 0.004 g pour une surface de $1 m^2$ de nanomatériau dans l'échantillon³. Un outil Microsoft® Excel d'aide à la préparation de l'essai est fourni sur le site de l'OCDE pour le calcul de la quantité de COD requise dans les échantillons.

39. Si l'essai est réalisé sans addition de MON, un tampon est nécessaire pour stabiliser le pH aux niveaux fixés. Au lieu de la MON, un tampon de bicarbonate de sodium 5 mM est ajouté, sous la forme de 2 ml de solution mère 0.1 M.

40. La force ionique est ensuite ajustée par addition de 0, 400 μ l et 4 ml de solution mère de $Ca(NO_3)_2$ 0.1M afin d'obtenir une concentration finale de 0, 1 et 10 mM respectivement dans le volume final de l'échantillon. Le volume est alors ajusté à 35 ml par addition d'eau.

41. Les paramètres recommandés pour le pH sont 4, 7 et 9 +/- 0.2 (9). Le pH des échantillons est obtenu par addition de HNO_3 ou NaOH à concentration relativement élevée (0.01 ou 0.1 M selon ce qui est le plus adapté pour le dosage), de telle sorte que le volume des échantillons reste pratiquement constant. Pour que soit atteint l'état d'équilibre, en particulier avec la MON, dont l'effet tampon est lent, un temps d'équilibrage des dispersions de 1 heure est nécessaire. Les tubes seront maintenus constamment fermés (sauf lors des prélèvements), afin de limiter autant que possible l'influence du CO_2 atmosphérique sur le pH des échantillons. L'utilisation d'une microélectrode (électrode de 3 mm de diamètre) est recommandée.

42. Après addition de MOD ou de tampon et ajustement de l'électrolyte et du pH, le volume des échantillons est ajusté à 40 ml. Chaque échantillon est alors soumis à 30 secondes de sonication dans un

³ Pour le calcul de cette valeur, on se reportera à l'Annexe 1B

bain à ultrasons, afin que les particules soient dispersées et bien mélangées dans la dispersion avant le début de l'essai.

43. Chaque condition d'essai doit être testée au minimum en triplicats.

1. introduire la dispersion mère du matériau testé
2. diluer à l'eau jusqu'à un volume de 20 ml
3. ajouter soit la solution mère de NaHCO_3 pour obtenir une concentration finale de 5 mM dans 40 ml, soit la solution mère de MON pour obtenir une concentration finale de COD de 10 mg/l
4. ajouter la solution de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ pour obtenir la concentration souhaitée, calculée pour un volume de 40 ml
5. ajouter de l'eau pour atteindre ~ 35 ml
6. ajuster le pH à la valeur souhaitée par adjonction de petites quantités d'une solution de HNO_3 ou de NaOH
7. laisser équilibrer pendant 1 h, et réajuster si nécessaire
8. compléter avec de l'eau jusqu'à 40 ml

	pH 4 5 mM NaHCO_3 ou 10 mg/l COD	pH 7 5 mM NaHCO_3 ou 10 mg/l COD	pH 9 5 mM NaHCO_3 ou 10 mg/l COD	
8				triplicat 1
5				
4				triplicat 2
3				
2				triplicat 3
1				
	0 mM 1 mM 10 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0 mM 1 mM 10 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	0 mM 1 mM 10 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	

Figure 3 : Schéma expérimental

Prélèvement et analyse du surnageant des tubes à essai

44. Des aliquotes du surnageant des tubes à essai préparés selon les indications des paragraphes 36-43 sont prélevées dans la partie supérieure, de 0.5-1 cm, de la dispersion. Dans certains cas, des particules auront tendance à adhérer à l'interface air/eau, et il convient de veiller à ne pas les prélever avec l'aliquote. Le volume recommandé pour les aliquotes ainsi prélevées est de 0.5 ml. Des aliquotes sont prélevées dans chaque tube toutes les heures dans l'essai étendu, depuis h 0 jusqu'à h 6, et à h 0 et h 6 dans l'essai de dépistage. Avant le sous-échantillonnage à h 6, les échantillons sont soumis à une centrifugation visant à accroître la sédimentation des particules indépendamment de leurs différentes densités. Un outil Microsoft® Excel d'aide à la préparation de l'essai est disponible sur le site de l'OCDE pour le calcul du temps de centrifugation nécessaire en fonction de la taille de particules adoptée comme seuil de coupure (valeur recommandée 1 μm) et de la densité des particules, ainsi que des paramètres de la centrifugeuse, tels que la vitesse de rotation et le rayon à la surface du liquide dans les tubes et au point d'échantillonnage. L'échantillon final sera prélevé 2 cm sous la surface de la dispersion et les paramètres de centrifugation seront calculés en conséquence.

45. Les sous-échantillons prélevés dans le surnageant sont dilués avant analyse par addition de 9.5 ml d'eau ultra pure. Les échantillons ainsi obtenus sont agités énergiquement à la main ou sur un agitateur vortex après préparation et juste avant l'analyse, pour une homogénéisation appropriée. Les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif (ICP-MS) ou spectrométrie d'émission optique couplée à un plasma inductif (ICP-OES), selon les concentrations attendues. Pour les digestats des échantillons contenant les particules (voir le paragraphe 46), ou s'il y a lieu de penser que les particules seront totalement atomisées, il est également possible d'utiliser la spectrométrie d'absorption atomique à four graphite. Pour les nanomatériaux constitués d'éléments non détectables par ces instruments (nanotubes de carbone ou fullerènes, par exemple), il convient de recourir à d'autres méthodes

d'analyse. Pour le prélèvement et l'analyse des particules qui se dissolvent, on tiendra compte du paragraphe 27.

46. Pour des résultats fiables, les échantillons préparés par la méthode décrite aux paragraphes 44 et 45 seront stockés dans l'obscurité à 4 °C et analysés dans les 24 heures suivant la préparation. Les échantillons de nanomatériaux solubles dans l'acide peuvent être stabilisés par dissolution, obtenue par addition d'un acide tel que HNO₃ concentré, et analysés sous la forme d'ions dissous. Si une mesure directe des nanomatériaux doit être réalisée (que ce soit pour des raisons pratiques ou pour éviter le long processus de digestion des échantillons), les techniques courantes d'analyse des suspensions seront appliquées (10). Les nanomatériaux doivent alors être stables en dispersion, ou des mesures doivent être prises pour assurer leur stabilité. Les échantillons pourront être dilués à l'eau ultra pure de façon suffisante pour assurer une stabilité accrue de la dispersion, ou des agents stabilisants devront être ajoutés (par exemple des surfactants comme le diphosphate tétrasodique ou un autre agent, s'il y a lieu). Si les nanomatériaux ne peuvent pas être stabilisés de façon à éviter les pertes par sédimentation ou adhésion aux parois des récipients, une solubilisation complète de l'échantillon devra être mise en œuvre, généralement par digestion acide assistée par micro-ondes. En faisant varier le pH, il convient d'éviter de passer par la valeur du PIE, ce qui provoquerait l'agglomération et la sédimentation des nanomatériaux pendant le stockage et l'analyse.

Complications possibles lors de la préparation et de l'analyse des échantillons

47. Les dispersions d'essai préparées selon les paragraphes 36-43 doivent être manipulées avec précaution pour ne pas être re-mélangées avant le prélèvement du surnageant. Des secousses, même minimales, peuvent provoquer un mélange indésirable, particulièrement dans la couche supérieure, de 0.5-1 cm, de l'échantillon.

ÉTUDE DE LA STABILITÉ DE DISPERSION AU MOYEN DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE UV-VISIBLE (UV-VIS)

48. Le suivi en continu du processus de sédimentation peut être réalisé par spectrophotométrie UV-VIS. Les échantillons destinés à l'analyse de la stabilité de dispersion par UV-VIS sont préparés par les méthodes décrites aux paragraphes 36-43 pour ce qui est de la composition des échantillons. Des cuvettes standard de 1 cm sont remplies de 3.5 ml d'échantillon. S'il s'agit d'échantillons de matériau précieux, des cuvettes de petit volume peuvent être utilisées, mais elles doivent être remplies à la même hauteur que les cuvettes de 1 cm contenant un volume de 3.5 ml. Les échantillons sont analysés par comparaison avec des échantillons de référence (blancs) dans un photomètre à double faisceau. Les blancs sont préparés comme les échantillons du matériau étudié, et contiennent tous les solutés, mais pas le nanomatériau étudié. Les spectrophotomètres UV-VIS ne permettant d'analyser qu'un échantillon à la fois, il n'est possible d'analyser qu'une seule condition expérimentale à la fois. On ne peut donc préparer chaque fois qu'un seul échantillon et le blanc correspondant. Tous les échantillons doivent être préparés

immédiatement avant les mesures UV-VIS, afin d'éviter l'agglomération des particules suivie d'une sédimentation accrue.

49. Avant les mesures, la ligne de base du spectromètre UV-VIS est réglée sur zéro par la mesure de deux échantillons blancs l'un par rapport à l'autre. L'échantillon à analyser est alors inséré dans le dispositif et analysé par rapport à l'échantillon blanc pendant une période de temps recommandée de 24 h, le logiciel du spectromètre étant configuré de telle sorte qu'une mesure soit réalisée toutes les 15 ou 30 minutes. Selon la conception du spectromètre par le constructeur, l'analyse est réalisée au fond de la cuvette UV-VIS (classiquement sur 1 cm en fond de cuvette) ; le temps d'analyse passe donc de 6 h (analyse du surnageant) à 24 h dans le spectromètre UV-VIS. Pour l'analyse des échantillons, il est recommandé d'utiliser la longueur d'onde d'absorption ou de diffusion maximale de la lumière compte tenu du signal de fond dû au blanc. Un signal de fond trop élevé (> 0.1 AU) doit être évité. Les propriétés spectrales du nanomatériau et des solutions d'essai, particulièrement en présence de MON, doivent être prises en compte dans la sélection de la longueur d'onde utilisée pour la mesure.

Complications lors des mesures UV-VIS

50. Les spectromètres UV-VIS ne permettant généralement d'analyser qu'un seul échantillon par 24 h, les mesures par cette technique nécessitent beaucoup de temps. Ainsi, pour étudier la stabilité de dispersion des nanomatériaux dans toutes les conditions hydrochimiques, sans dupliquer aucune mesure, 30 jours de mesure complets sont nécessaires pour l'essai étendu.

51. Le suivi de la concentration de particules peut être réalisé au moyen d'un spectromètre UV-VIS par mesure de la turbidité dans l'axe, dans laquelle l'atténuation du faisceau incident par diffusion de la lumière par les particules est utilisée comme signal de concentration, ou l'absorption de la lumière dans le cas de particules absorbant spécifiquement la lumière à une certaine longueur d'onde. La mesure de la turbidité dans l'axe (la source lumineuse, l'échantillon et le détecteur sont situés sur un même axe optique) présente certains inconvénients ; c'est pourquoi les mesures de turbidité sont généralement réalisées dans des turbidimètres hors axe, dans lesquels la lumière diffusée par les particules est enregistrée à un angle donné (généralement égal à 90°) par rapport au faisceau incident. On prendra soin d'éviter l'influence de l'absorption de fond liée à l'ion NO_3 ou à la MON ajoutée. Il est recommandé de présenter les résultats sous forme de valeurs relatives par rapport à la première mesure de l'absorption (A/A_0). La longueur d'onde utilisée sera indiquée.

52. Il importe de tenir compte des propriétés photocatalytiques éventuelles des nanomatériaux étudiés. Si les particules présentent une activité photocatalytique, l'analyse des échantillons contenant de la MON doit être réalisée à une longueur d'onde ≥ 380 nm ou au moins hors de la bande d'absorption du photocatalyseur. Si cette condition n'est pas respectée, les interactions des particules analysées avec le rayonnement UV peuvent provoquer la destruction (partielle) des molécules de MON, suite à la formation de radicaux. Pour l'analyse des particules qui se dissolvent, on tiendra compte du paragraphe 27.

53. Une attention particulière doit être accordée au choix des cuvettes pour les mesures UV-VIS. Les cuvettes en plastique ne sont recommandées que lorsque l'irradiation UV doit être évitée.

54. Enfin, il faut veiller à la propreté des cuvettes UV-VIS. Les particules étant susceptibles d'adhérer aux parois des cuvettes, celles-ci doivent être prélavées au HNO_3 5 N avant chaque mesure, et rincées ensuite plusieurs fois à l'eau ultra pure. Un lavage mécanique des surfaces peut être nécessaire pour éviter les transferts de produit, en cas d'utilisation de cuvettes non jetables. Le dépôt de particules à la

surface des cuvettes peut interférer avec les mesures de stabilité en donnant une concentration de nanomatériau dans la dispersion plus élevée qu'elle ne l'est en réalité.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Traitement des données

55. Les résultats relatifs à la stabilité de dispersion des échantillons préparés conformément aux paragraphes 36-43 et analysés conformément aux paragraphes 50-52 sont présentés sous forme de graphique indiquant le pourcentage de nanomatériau restant dans le surnageant après 6 h suivies de centrifugation (2 temps de mesure dans l'essai de dépistage), ou de graphique où l'axe des X représente le moment d'échantillonnage (de 0 à 6 h dans l'essai étendu) et l'axe des Y, la concentration du nanomatériau analysé en pourcentage (%) de la concentration initiale (à h 0) du matériau dans les échantillons d'intérêt ($C_{\text{mesurée}}/C_{\text{initiale}} \times 100$ (%)). Les données relatives à la dépendance au pH et à la force ionique (3 expériences pour chacun de ces paramètres) sont représentées sur un même graphique permettant de visualiser l'effet de ces deux paramètres. Les écarts types sont calculés sur la base des mesures en triplicats réalisées à chaque point dans le temps et peuvent être représentés sur les graphiques. La mesure à h 0 peut différer de la concentration calculée attendue, après dilution de la solution mère, en raison de pertes survenues lors de la procédure de dispersion et de la préparation des échantillons (réglage du pH et de la force ionique). C'est pourquoi les concentrations mesurées doivent être exprimées par rapport à la concentration au point h 0 (C_{initiale} , correspondant à 100 %), et l'écart par rapport à la concentration calculée attendue à h 0 doit être consigné.

56. En cas d'études du comportement d'agglomération des particules par UV-VIS, les résultats sont présentés sous forme de graphiques où l'axe des X représente le temps (0 à 24 h) et l'axe des Y, l'absorption mesurée à un instant donné, rapportée à la valeur initiale de l'absorption à h 0 par rapport à l'échantillon blanc dans le faisceau de référence ($A_{\text{mesurée}}/A_{\text{initiale}}$).

57. En fonction des résultats obtenus selon les paragraphes 55 ou 56, respectivement, les nanomatériaux étudiés peuvent être classés d'après les critères de la figure 2, l'option (a) correspondant à une stabilité de dispersion faible (< 10 %), l'option (b) à une stabilité de dispersion intermédiaire basse ($10 \% < x < 50$ %) ou élevée ($50 \% \leq x < 90$ %) et l'option (c) à une stabilité de dispersion élevée (≥ 90 %). Les nanomatériaux dont la stabilité de dispersion correspond à l'option (a), soit à une concentration ≤ 10 % de la concentration initiale (mesurée à h 0) après 6 h pour toutes les conditions de l'essai de dépistage, peuvent être considérés comme des nanomatériaux dont la stabilité de dispersion est faible. Les nanomatériaux restant à une concentration ≥ 90 % (c) de la concentration initiale (mesurée à h 0) après 6 h dans toutes les conditions de l'essai de dépistage peuvent être considérés comme des nanomatériaux dont la stabilité de dispersion est élevée. Les nanomatériaux n'appartenant à aucune de ces deux catégories (option (b), par conséquent) seront considérés comme des nanomatériaux dont la stabilité de dispersion est dépendante des conditions. Dans ce dernier cas, la stabilité de dispersion sera examinée en fonction des conditions particulières de l'essai.

58. Dans le cas où l'essai étendu a été réalisé, des conclusions seront formulées sur les tendances de la séparation de phases et les caractéristiques de la séparation d'après l'évolution des données mesurées toutes les heures (voir le schéma de la figure 1), par exemple sédimentation due à la densité ou à l'agglomération, influence des modifications des nanomatériaux au cours de l'essai sur la stabilité de dispersion, ou comportement de sédimentation des nanomatériaux hétérogènes.

Rapport d'essai

59. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

- (a) Informations sur le nanomatériau testé : marque, nom, informations sur les paramètres physicochimiques mentionnés au paragraphe 23 et méthodes de mesures correspondantes
- (b) Sonicateur : marque/type et résultats de la calibration, puissance, amplitude et temps d'application, mode de fixation de l'échantillon et volume de la dispersion mère
- (c) Concentration massique et numérique du nanomatériau dans les échantillons testés, d'après les données sur le diamètre moyen des particules (provenant du fabricant ou d'une caractérisation du matériau)
- (d) Écart (en %) entre la concentration de nanomatériau mesurée à h 0 (C_{initiale}) et la concentration attendue dans la dispersion
- (e) Perte par adhésion aux parois des tubes et utilisation de tubes constitués d'un autre matériau (s'il y a lieu)
- (f) Concentration d'électrolyte dans les échantillons étudiés
- (g) Composition chimique de la MON et concentration (en COD) dans les échantillons étudiés
- (h) pH des échantillons étudiés après le temps d'équilibrage et à l'issue de l'expérience
- (i) Paramètres de centrifugation des échantillons (dimensions du rotor, rayon à la surface de l'échantillon et au point d'échantillonnage, rotations par minute, force centrifuge relative et temps de centrifugation)
- (j) Méthode analytique : mesure directe ou digestion, principe de mesure, type d'instrument et constructeur, facteurs de dilution, durée de stockage
- (k) Essai de dépistage : tableau indiquant la concentration relative ($C_{\text{mesurée}}/C_{\text{initiale}}$) x 100 (%) dans les conditions d'essai après 6 h suivies de centrifugation, avec indication du coefficient de variation des réplicats
- (l) Essai étendu : courbe de la concentration relative ($C_{\text{mesurée}}/C_{\text{initiale}}$) x 100 (%) en fonction du temps (0-6 h) en cas d'analyse du surnageant
- (m) Essai étendu : tableau indiquant les valeurs des concentration finales ($C_{\text{mesurée}}/C_{\text{initiale}}$) x 100 (%) (valeurs à h 6) en cas d'analyse du surnageant
- (n) En cas de mesures réalisées par UV-VIS : courbes d'absorption relative ($A_{\text{mesurée}}/A_{\text{initiale}}$) en fonction du temps (0-24 heures)
- (o) Interprétation du comportement d'agglomération du matériau étudié selon les paragraphes 57-58 et la figure 2
- (p) Quantité de fraction dissoute de nanomatériaux après 6 h, en % et en mg/l, s'il y a lieu.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) von der Kammer, F., S. Ottofuelling and T. Hofmann (2010). Assessment of the Physico-Chemical Behavior of Titanium Dioxide Nanoparticles in Aquatic Environments Using Multi-dimensional Parameter Testing. *Environmental Pollution*, 158 (12): 3472-3481.
- (2) Ottofuelling, S., F. von der Kammer and T. Hofmann (2011). Commercial titanium dioxide nanoparticles in both natural and synthetic water: comprehensive multidimensional testing and prediction of aggregation behaviour. *Environmental Science & Technology*, 45:10045 – 10052
- (3) Salminen, R., et al. (2005). FOREGS-EuroGeoSurveys Geochemical Baseline Database; Geochemical Atlas of Europe. Part 1: Background Information, Methodology and Maps. Espoo: Geological Survey of Finland, p. 526. <http://www.gtk.fi/publ/foregsatlas/>
- (4) Rasmussen, K., et al. (2014). Titanium Dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105: Characterisation and Physico-Chemical Properties. Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/jrc-nanomaterials-repository>
- (5) Klein, C. L., et al. (2011). NM-Series of Representative Manufactured Nanomaterials NM-300 Silver Characterisation, Stability, Homogeneity. Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/jrc-nanomaterials-repository>
- (6) Rasmussen, K., et al. (2014). Multi-walled Carbon Nanotubes, NM-400, NM-401, NM-402, NM-403: Characterisation and Physico-Chemical Properties. Luxembourg: Publications Office of the European Union. <https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/jrc-nanomaterials-repository>
- (7) IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- (8) Nelson, W.G, et al. (2015). Suwannee River Natural Organic Matter: Isolation of the 2R101N Reference Sample by Reverse Osmosis. *Environmental Engineering Science*, 32 (1): 38-44.
- (9) OECD (2004). *Guideline for the Testing of Chemicals, No. 111: Hydrolysis as a Function of pH*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) Santos, M.C. & Nóbrega, J.A. (2006). Slurry Nebulization in Plasmas for Analysis of Inorganic Materials. *Applied Spectroscopy Reviews*, 41: 427-448

ANNEXE 1. DÉFINITIONS

Agglomération – Processus de contact et d’adhésion par lequel des particules dispersées sont maintenues ensemble par de faibles interactions physiques, conduisant finalement à une sédimentation accrue par formation de précipités de plus grande taille que les colloïdes (agglomérats) légèrement modifié selon (7). À la différence de l’agrégation, dans laquelle les particules sont maintenues par des liens forts tels que des ponts de frittage, l’agglomération est un processus réversible.

BET – Méthode de détermination, par adsorption de gaz, de la surface spécifique des poudres selon la théorie de Brunauer-Emmett-Teller.

CCC – Concentration critique de coagulation : concentration d’un contre-ion spécifique (cation pour les particules chargées négativement, anion pour les particules chargées positivement) à laquelle les forces répulsives entre particules sont proches de zéro et l’agglomération entre dans un régime rapide limité par la diffusion. A la CCC, l’efficacité d’attachement α devient égale à 1 et le taux de stabilité W à zéro.

COD Carbone organique dissous : carbone organique complexé, dans un échantillon d’eau, qui passe un filtre de 0.45 μm , et fait partie des MOD. Les MOD sous forme de substances humiques contiennent ~ 50 % de COD.

Concentrations Les concentrations de particules et de MON dans les échantillons sont indiquées en grammes par litre (g/l), milligrammes par litre (mg/l) et microgrammes par litre ($\mu\text{g/l}$). Dans le cas de la MON, la concentration est indiquée en mg de COD par litre. Les concentrations d’électrolytes ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et NaHCO_3) dans les échantillons sont indiquées en millimoles par litre (mM/l).

Dispersibilité – Propriété d’un matériau dispersible, ou mesure de sa capacité à être dispersé dans un milieu dispersant ou une phase continue. La stabilité de dispersion désigne la capacité d’une dispersion à résister à un changement de ses propriétés dans le temps.

Durée de l’expérimentation – Temps nécessaire à la détermination de la stabilité de dispersion des particules, mesuré en heures (h). La durée de l’expérimentation est de 6 heures pour l’échantillonnage dans le surnageant et de 24 h pour la photométrie UV-VIS.

Effet expérimental mesuré Mesure de la concentration de particules dans la partie supérieure, de 0.5-1 cm, d’une dispersion après 6 heures d’expérimentation suivies d’une séparation par centrifugation des particules de 1 μm de diamètre (approximation pour des particules solides sphériques ayant la densité nominale du matériau). La concentration dans le surnageant après centrifugation est rapportée à la concentration initiale de particules déterminée lors de la première mesure à h 0, et exprimée sous la forme d’un pourcentage (%) tel que : effet expérimental mesuré = $(C_{\text{mesurée}}/C_{\text{initiale}}) \times 100$. Dans le protocole de

spectrophotométrie UV-VIS, l'effet expérimental mesuré est $A_{\text{mesurée}}/A_{\text{initiale}} \times 100$, exprimé en pourcentage (%).

MON – Matière organique naturelle : substances organiques présentes dans les eaux superficielles ou souterraines. La MON comprend une fraction humique et une fraction non humique (polysaccharides). En pratique, on distingue la matière organique dissoute (MOD) et la matière organique particulaire (MOP). La MOD passe un filtre de 0.45 μm , la MOP est retenue par ce filtre. La MOP telle qu'elle est définie ici ne doit pas être confondue avec le carbone organique purgeable.

PCN – Point de charge nulle : point auquel la densité de charge de surface est égale à zéro en l'absence d'ions spécifiquement adsorbants. Sa valeur est donnée sous forme de logarithme négatif de l'ion déterminant le potentiel. Dans la plupart des cas, l'ion déterminant le potentiel est le proton et cette valeur est alors donnée sous forme de pH. Le PCN est alors également désigné par le terme de point de charge protonique nette nulle (point of zero net proton charge – PZNPC).

PIE – Point isoélectrique : pH auquel le potentiel zêta ou la mobilité des particules en réponse à un champ électrique est de zéro. Ce n'est qu'en l'absence d'ions spécifiquement adsorbants modifiant la charge de surface par rapport à la surface d'origine que le PIE est égal au PCN.

Potentiel zêta – potentiel électrocinétique : potentiel électrique au niveau du plan de cisaillement de la double couche diffuse. Le potentiel zêta est dérivé de phénomènes électrocinétiques, le mouvement des particules dans un champ électrique. La conversion des mesures de mobilité électrophorétique en potentiel zêta fait appel à diverses hypothèses relatives aux propriétés de la double couche. Aussi longtemps que ces hypothèses sont identiques, les résultats de la conversion et, donc, les potentiels zêta obtenus sont identiques. Lorsque l'on indique des potentiels zêta, il convient de préciser les hypothèses adoptées pour les rendre comparables.

SRNOM – Suwannee River NOM : MON des eaux de surface, provenant du fleuve Suwannee (États-Unis), adoptée comme standard par l'International Humic Substance Society (IHSS) ; elle est isolée par osmose inverse et purifiée selon le protocole de l'IHSS. Elle peut être achetée auprès de l'IHSS.

Taille – Taille des particules, agrégats ou agglomérats, indiquée en micromètres (μm) ou nanomètres (nm). La méthode de détermination de la taille des particules et le caractère de la taille moyenne des particules seront précisés dans le rapport.

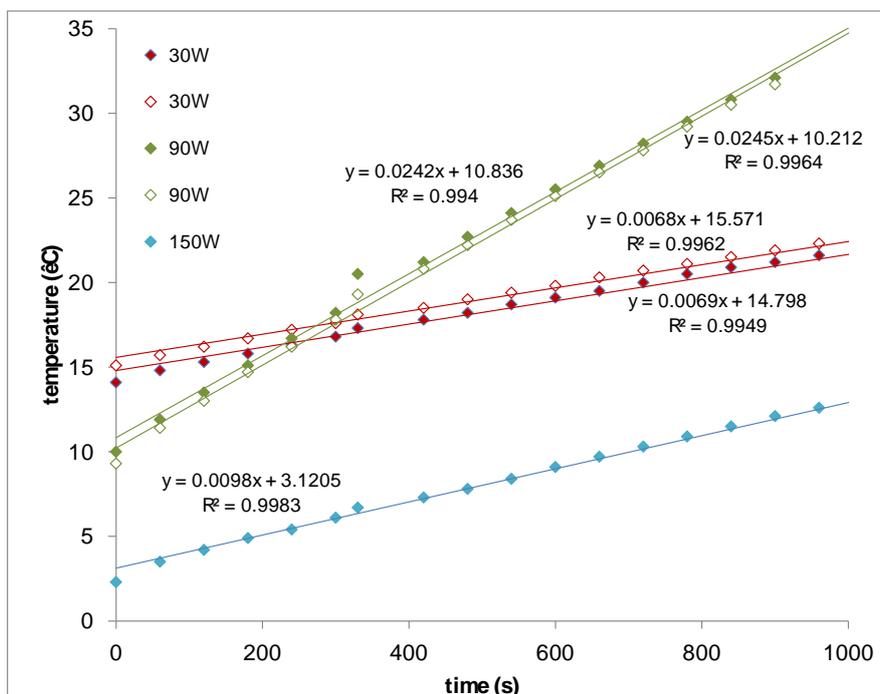
ANNEXE 2

A. UTILISATION D'UNE SONDE À ULTRASONS : DÉTERMINATION DE L'ÉNERGIE ACOUSTIQUE DÉLIVRÉE PAR MESURES CALORIMÉTRIQUES

60. Lors de la préparation de la dispersion de particules à analyser, la sonication est normalement utilisée afin d'obtenir une distribution homogène des particules sous forme de dispersion. Il convient de déterminer au préalable l'énergie acoustique délivrée, par des mesures calorimétriques. L'augmentation de température liée à l'application d'énergie ultrasonique à 500 ml d'eau par une sonde de sonication a été mesurée, et l'énergie délivrée a été calculée par évaluation de la pente de la courbe de températures, d'après la formule :

$$E = \frac{dT}{dt} m C_p$$

où $\frac{dT}{dt}$ est le changement de température du milieu ($T_{\text{finale}} - T_{\text{initiale}}$) pendant la durée de l'expérience ($t_{\text{fin}} - t_{\text{début}}$), C_p la capacité calorifique spécifique du milieu (4.184 kJ/g*K pour l'eau), et m la masse du milieu (g). La valeur de $\frac{dT}{dt}$ peut être établie directement à partir de l'équation de la courbe de tendance linéaire présentée à la figure A1. La courbe de tendance linéaire a pour équation générale $y = kx + b$, où $k = \frac{dT}{dt}$ correspond à la pente de la droite. Un outil Microsoft® Excel d'aide à la préparation de l'essai est disponible sur le site de l'OCDE pour le calcul de l'énergie acoustique délivrée.



Légende de la figure : time (s) = temps (s)

Temperature (°C) = température (°C)

Figure A1. Détermination de la pente de la courbe de tendance linéaire ajustée. Les droites ne se trouvent pas les unes au-dessus des autres parce que la température initiale était différente. Mais les pentes sont identiques pour les deux courbes 30 W, d'une part, et les deux courbes 90 W, d'autre part. La pente reflète l'apport en énergie.

B. TiO₂ (NM-105), Ag (NM-300K) et NANOTUBES DE CARBONE MULTIPAROIS (NM-400) COMME MATÉRIAUX DE RÉFÉRENCE POUR LA STABILITÉ DE DISPERSION SELON LE pH, LA FORCE IONIQUE ET LA MON

61. Le déroulement et les résultats de l'essai appliqué aux matériaux NM-105, NM-300K et NM-400 sont présentés dans ce qui suit à titre d'aide.

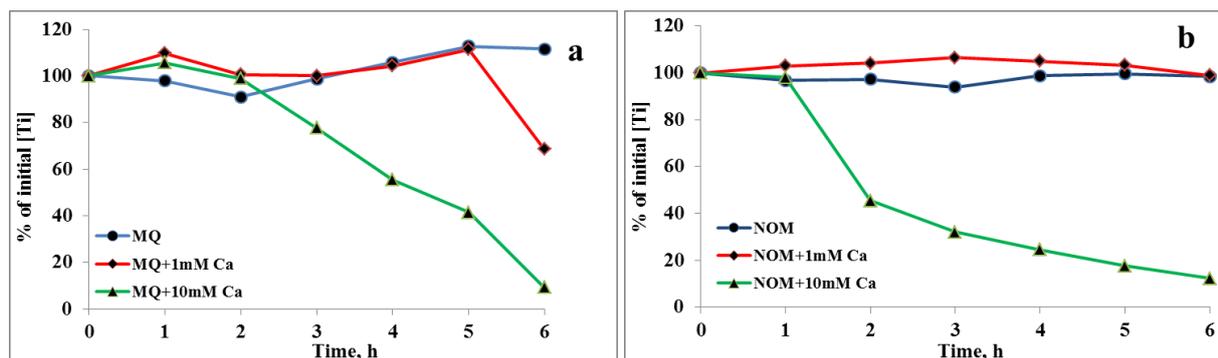
Influence de l'électrolyte/ du COD sur le comportement d'agglomération des particules

62. Afin d'étudier l'influence de la concentration d'électrolyte/de COD sur l'agglomération des particules, des échantillons contenant 0, 1 et 10 mM de Ca(NO₃)₂ avec/sans 30 mg/l de COD ont été préparés. La concentration de 30 mg/l a été retenue comme scénario le plus défavorable, mais a été ramenée par la suite à 10 mg/l, les effets étant comparables et ce choix permettant de réduire le coût d'achat de la matière organique suggérée (SRNOM). Le schéma expérimental proposé pour l'étude de l'influence de l'électrolyte/du COD sur le comportement d'agglomération des nanomatériaux est présenté à la figure A2.

Triplicat 3	0 mM Ca(NO ₃) ₂ 1 mM Ca(NO ₃) ₂ 10 mM Ca(NO ₃) ₂	40 ml	5	<ol style="list-style-type: none"> 1. Introduire l'échantillon de particules caractérisées 2. Diluer à l'eau jusqu'à un volume de 20 ml 3. Ajouter la solution de MOD pour obtenir la concentration souhaitée dans un volume de 40 ml 4. Ajouter la solution de Ca(NO₃)₂ pour obtenir la concentration souhaitée dans un volume de 40 ml 5. Compléter avec de l'eau ultra pure jusqu'à 40 ml
Triplicat 2			4	
Triplicat 1		20 ml	3	
			2	
			1	

Figure 2A. Schéma expérimental possible pour l'étude de l'influence de l'électrolyte et du COD sur le comportement d'agglomération des nanoparticules.

63. La présence de l'électrolyte Ca(NO₃)₂ dans la dispersion entraîne une agglomération des nanomatériaux proportionnelle à la concentration d'électrolyte (figure A3a). La présence de COD stabilise toutefois la dispersion, pour une concentration d'électrolyte de 1 mM (figure A3b). Lors de cet essai, il n'a pas été procédé à une stabilisation ou à un ajustement du pH.



Légende de la figure : Time, h = Temps, h

% of |Ti| initial = % de |Ti| initial

NOM = MON

Figure A3. Comportement d'agglomération de nanoparticules de TiO_2 (NM-105) (a) dans un milieu à 0, 1, 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, (b) dans un milieu à 0, 1, 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et 30 ppm de COD. À partir des données obtenues sur la stabilité à différentes concentrations de Ca et avec/sans MON, TiO_2 est considéré comme un nanomatériau présentant une stabilité de dispersion intermédiaire, dépendante des conditions.

64. Les écarts de la concentration de nanomatériau à h 0 dans les expériences illustrées par la figure A3, exprimés en %, sont présentés aux tableaux 1 et 2. Ils correspondent à la différence entre la concentration de nanomatériau attendue, calculée d'après la masse sèche de matériau dans la dispersion, et la concentration de nanomatériau mesurée à h 0.

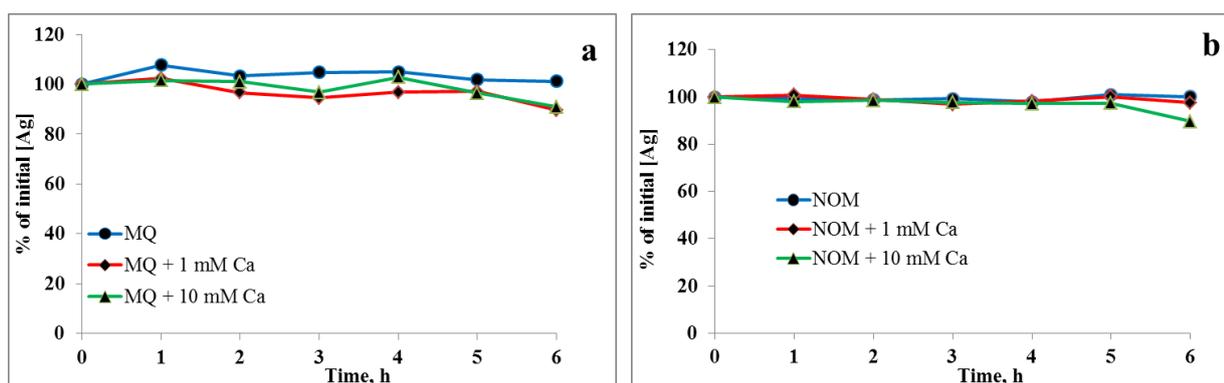
Tableau 1 Écarts de la concentration de nanomatériau mesurée à h 0 lors des expériences présentées à la figure A3 (a)

Figure A3 (a)	MQ	MQ + 1 mM Ca	MQ + 10 mM Ca
calculée, mg/l	1.48	1.48	1.48
mesurée, mg/l	1.25 ± 0.01	1.21 ± 0.12	1.21 ± 0.04
écart, %	-15.3 ± 0.8	-18.1 ± 7.9	-18.2 ± 2.8

Tableau 2 Écarts de la concentration de nanomatériau mesurée à h 0 lors des expériences présentées à la figure A3 (b)

Figure A3 (b)	MON	MON + 1 mM Ca	MON + 10 mM Ca
calculée, mg/l	1.48	1.48	1.48
mesurée, mg/l	1.60 ± 0.08	1.56 ± 0.09	1.51 ± 0.15
écart, %	7.9 ± 5.2	5.4 ± 6.4	2.5 ± 9.9

65. La présence d'électrolyte ou de COD n'influe pas sur la stabilité des dispersions d'Ag (NM-300K), comme le montre la figure A4. Les dispersions restaient stables pendant toute la durée de l'expérience. Lors de cet essai, il n'a pas été procédé à une stabilisation ou à un ajustement du pH.



Légendes figure A4 Time, h = Temps, h % of initial [Ag] = % de [Ag] initial

NOM = MON

Figure A4. Comportement d'agglomération de nanoparticules d'Ag (NM-300K) (a) dans un milieu à 0, 1, 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, (b) dans un milieu à 0, 1, 10 mM de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ et 30 ppm de COD. Toutes les particules sont stables dans toutes les conditions (> 90 % après 6 h), NM-300K est donc considéré comme un nanomatériau présentant une stabilité de dispersion élevée.

66. Les écarts de la concentration de nanomatériau à h 0 dans les expériences illustrées par la figure A4, exprimés en %, sont présentés aux tableaux 3 et 4.

Tableau 3 Écarts de la concentration de nanomatériau mesurée à h 0 lors des expériences présentées à la figure A4 (a)

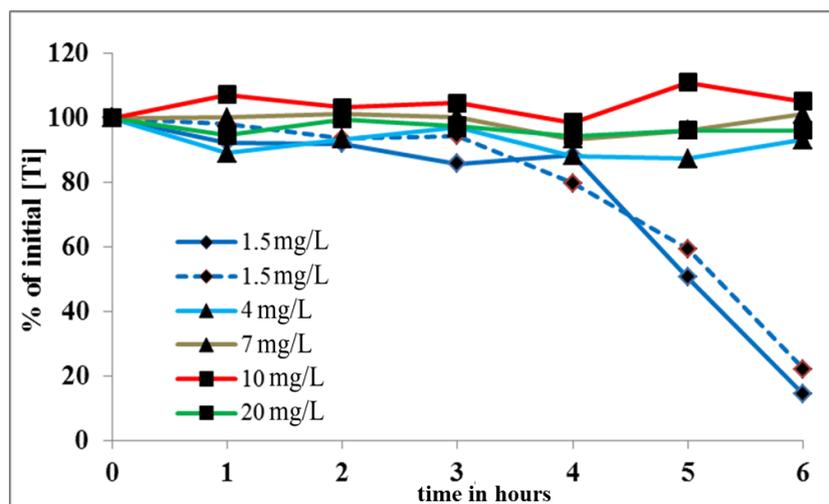
Figure 4 (a)	MQ	MQ + 1 mM Ca	MQ + 10 mM Ca
calculée, $\mu\text{g/l}$	1000	1000	1000
mesurée, $\mu\text{g/l}$	700 ± 73	693 ± 24	675 ± 18
écart, %	-30 ± 7	-31 ± 2	-32 ± 2

Tableau 4 Écarts de la concentration de nanomatériau mesurée à h 0 lors des expériences présentées à la figure A4 (b)

Figure 4 (b)	MON	MON + 1 mM Ca	MON + 10 mM Ca
calculée, $\mu\text{g/l}$	1000	1000	1000
mesurée, $\mu\text{g/l}$	760 ± 10	739 ± 8	701 ± 21
écart, %	-24 ± 1	-26 ± 1	-30 ± 2

Calcul de la quantité de COD requise

67. La concentration de COD a d'abord été fixée à 30 mg/l, ce qui correspond au 95^e percentile des concentrations de COD relevées dans les eaux de surface (pour les données, voir la base de données Atlas géochimique européen du FOREGS). Compte tenu du fait qu'à 30 mg/l de COD, pH 4 ou 5 et 10 mmol/l de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, il existe un risque d'agglomération de la MON, la concentration peut en principe être réduite, les effets stabilisants pouvant être observés dès 1.5 mg/l pour quatre heures et dès 4 mg/l pour 6 h, dans le cas du TiO_2 (figure A5). La concentration de COD suggérée pour les essais a donc été abaissée à 10 mg/l.



Légendes figure A5 :

time in hours = temps en heures

% of initial Ti = % de |Ti| initial

Figure A5. Stabilité de dispersion de nanoparticules de TiO₂ (NM-105) pour 1 mM de Ca(NO₃)₂ et différentes concentrations de MON.

68. En principe, deux effets majeurs de la MON augmentent la stabilité de dispersion. L'un est l'adsorption de MON à la surface des nanomatériaux, qui augmente le potentiel négatif en surface du fait de la nature anionique des molécules de MON déprotonées dans les conditions de pH testées. Le second est la complexation des ions calcium par la MON et la réduction de l'activité du calcium. Pour que l'effet d'adsorption en surface intervienne, le ratio entre les molécules de MON et la surface de nanomatériau disponible dans la dispersion est plus important qu'une concentration massique exprimée sous la forme d'une valeur de COD donnée. Lorsqu'un même nanomatériau est présent en différentes tailles, la même quantité de MON pourrait avoir moins d'effet sur le matériau présentant des particules plus petites et donc une surface plus grande. Une concentration de 10 mg/l de COD pourrait être suffisante pour la plupart des nanomatériaux pour simuler l'effet de la MON dans les eaux de surface. Si des concentrations de COD plus faibles sont utilisées, la quantité minimale de COD dans les échantillons étudiés devrait être basée sur la surface des particules analysées dans l'échantillon. Par m² de surface de nanomatériau dans la dispersion, la valeur recommandée est de 0.004 g de COD. Cette valeur repose sur l'hypothèse selon laquelle au moins 1 molécule de MON par nm² de surface de nanomatériau est nécessaire pour une stabilisation efficace de la dispersion. 1 m² équivaut à 1 x 10¹⁸ nm², c'est donc le nombre de molécules de MON (1 x 10¹⁸) nécessaires pour la stabilisation. Considérant que la masse molaire de la MON est d'environ 1500 g/mol et sachant que le nombre d'Avogadro est de 6.02×10²³, on peut calculer la quantité de MON (g) nécessaire pour 1 m², soit 2.5 mg. Cette valeur peut être convertie en 1.25 mg de COD par m² (2.5 mg divisé par 2), la MON contenant environ 50 % de carbone en poids. Une marge de sécurité étant requise pour tenir compte des incertitudes inhérentes aux hypothèses précédentes, la valeur obtenue est multipliée par 3 environ, ce qui donne 0.004 g de COD par m².

69. L'utilisation de SRNOM fournit à l'expérimentateur une MON bien caractérisée et purifiée. En raison des différences de composition des MON de différentes sources, il est difficile de comparer les résultats obtenus avec différents types de MON. La SRNOM peut être remplacée par un autre type de MON, à condition que le matériau de substitution ait une origine/composition similaire et présente des niveaux de pureté comparable à celui de la SRNOM. Les tableaux 5 et 6 montrent les différences entre la

SRNOM et l'acide humique Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Humic Acid, HA) pour ce qui est de leur teneur en cations et en anions.

Tableau 5 : Analyse élémentaire de la MON du fleuve Suwannee et de l'acide humique Sigma-Aldrich (HA)

	Ca	Mg	Na	K	Fe	Ni	Cu	Mn	Co
SRNOM	1.4 +/- 0.6	0.17 +/- 0.01	315 +/- 2.9	5.9 +/- 0.6	8.8 +/-1.28	<0,01	0.05 +/-0.04	<0,01	<0,01
SigmaHA	92.2 +/- 10	6.1 +/- 0.1	698 +/- 4	55.3 +/- 0.3	40.8 +/- 2	0.33 +/-0.03	0.3 +/-0.05	0.03 +/-0.01	0.07 +/-0.01

SRNOM : matière organique naturelle du fleuve Suwannee, HA : acide humique. (Concentrations en mg/l pour une solution à 1000 mg/l de COD)

Tableau 6 : Analyse par chromatographie ionique de la MON du fleuve Suwannee et de l'acide humique Sigma-Aldrich (HA)

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
SRNOM	n.d.	55.8	n.d.	0.5	35	n.d.	11.3
SigmaHA	2.5	277	n.d.	0.6	20	n.d.	7.8

SRNOM : matière organique naturelle du fleuve Suwannee, HA : acide humique. (Concentrations en mg/l pour une solution à 1000 mg/l de COD)

Influence du pH sur le comportement d'agglomération des particules

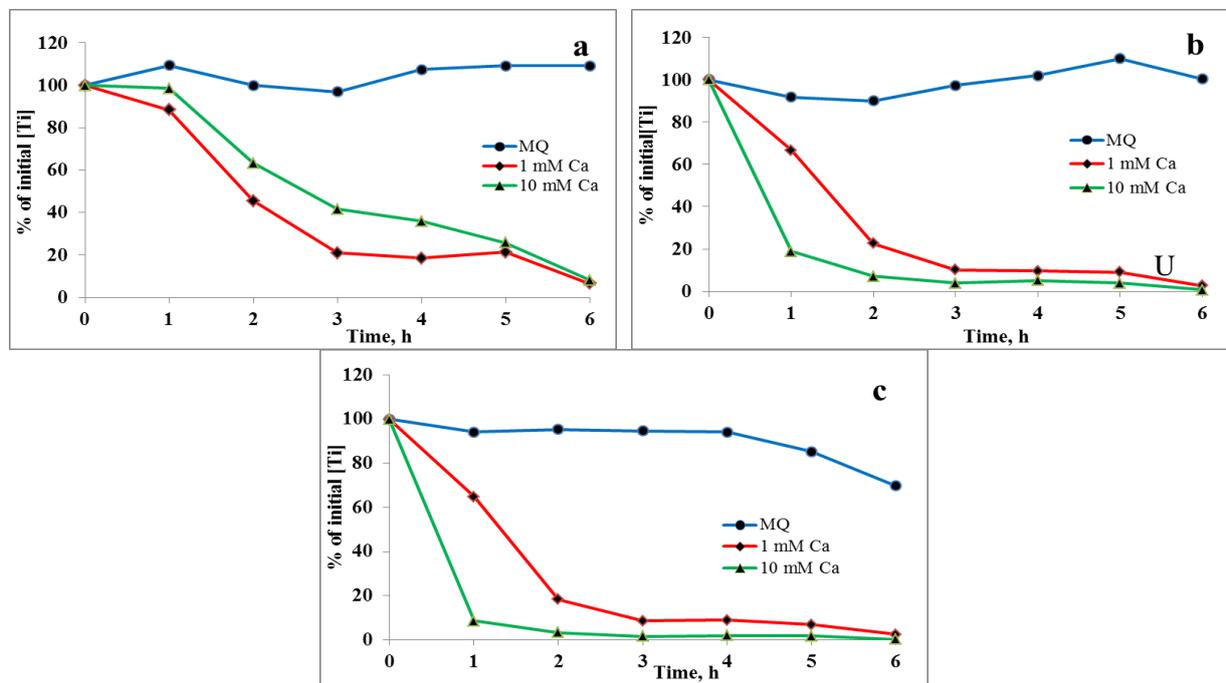
70. Pour l'étude de la stabilité de dispersion des nanomatériaux testés (TiO₂ (NM-105), Ag (NM-300K) et nanotubes de carbone (NM-400)) dans le milieu d'essai pour un pH donné et sans addition de MON, NaHCO₃ a été utilisé comme agent tampon. Le schéma expérimental est présenté à la figure A8.

1. Introduire l'échantillon de particules analysé
2. Diluer à l'eau jusqu'à un volume de 20 ml
3. Ajouter la solution de Ca(NO₃)₂ pour obtenir la concentration souhaitée dans un volume de 40 ml
4. Ajouter la solution de NaHCO₃ pour obtenir une concentration de 5 mM dans un volume de 40 ml
5. Compléter avec de l'eau jusqu'à 40 ml

		pH = 5 5 mM NaHCO ₃			pH = 7 5 mM NaHCO ₃			pH = 8.5 5 mM NaHCO ₃			
40 m : 20 ml	5										triplicat 3
	4										triplicat 2
	3										triplicat 1
	2										
	1										
		0 mM Ca(NO ₃) ₂	1 mM Ca(NO ₃) ₂	10 mM Ca(NO ₃) ₂	0 mM Ca(NO ₃) ₂	1 mM Ca(NO ₃) ₂	10 mM Ca(NO ₃) ₂	0 mM Ca(NO ₃) ₂	1 mM Ca(NO ₃) ₂	10 mM Ca(NO ₃) ₂	

Figure A8 : Schéma expérimental possible pour l'étude du comportement d'agglomération des nanoparticules à un pH donné.

71. La stabilité de dispersion des particules a été testée au pH de 8.5, celui des 3 pH étudiés (5/7/8.5) pour lequel l'instabilité était la plus grande. Les résultats obtenus pour TiO_2 (NM-105) sont présentés à la figure A9.

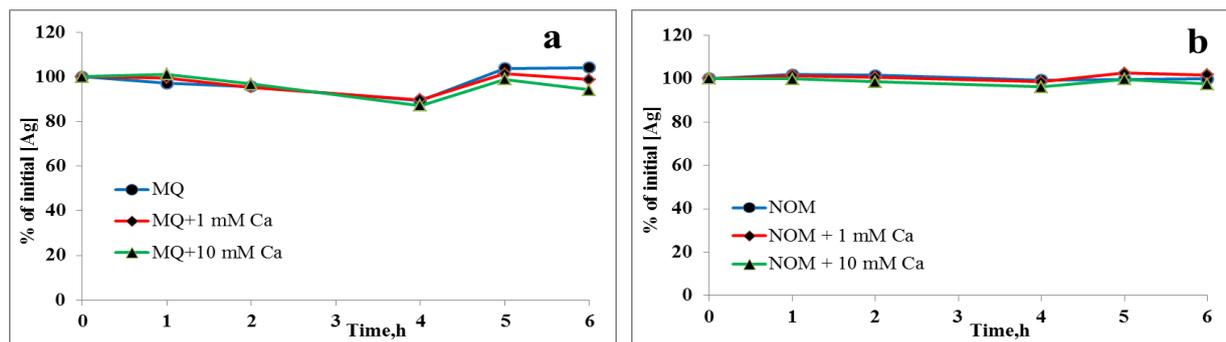


Légende figure A9 : Time, h = Temps, h

% of initial Ti = % de [Ti] initial

Figure A9. Comportement d'agglomération de nanoparticules de TiO_2 (NM-105) au pH de 8.5. Les valeurs du pH ont été établies en présence de (a) NaHCO_3 à 1 mM (b) NaHCO_3 à 5 mM (c) NaHCO_3 à 10 mM, et le pH est resté stable pendant toute la durée de l'expérimentation. À partir des données obtenues sur la stabilité à différentes concentrations de Ca, TiO_2 est considéré comme un nanomatériau présentant une stabilité de dispersion intermédiaire dépendante des conditions.

72. Le changement de pH des dispersions (pH = 8.5) n'influe pas sur la stabilité des dispersions de Ag (NM-300K), comme le montre la figure A10.



Légende figure :

Time, h = Temps, h

% of initial Ag = % de [Ag] initial

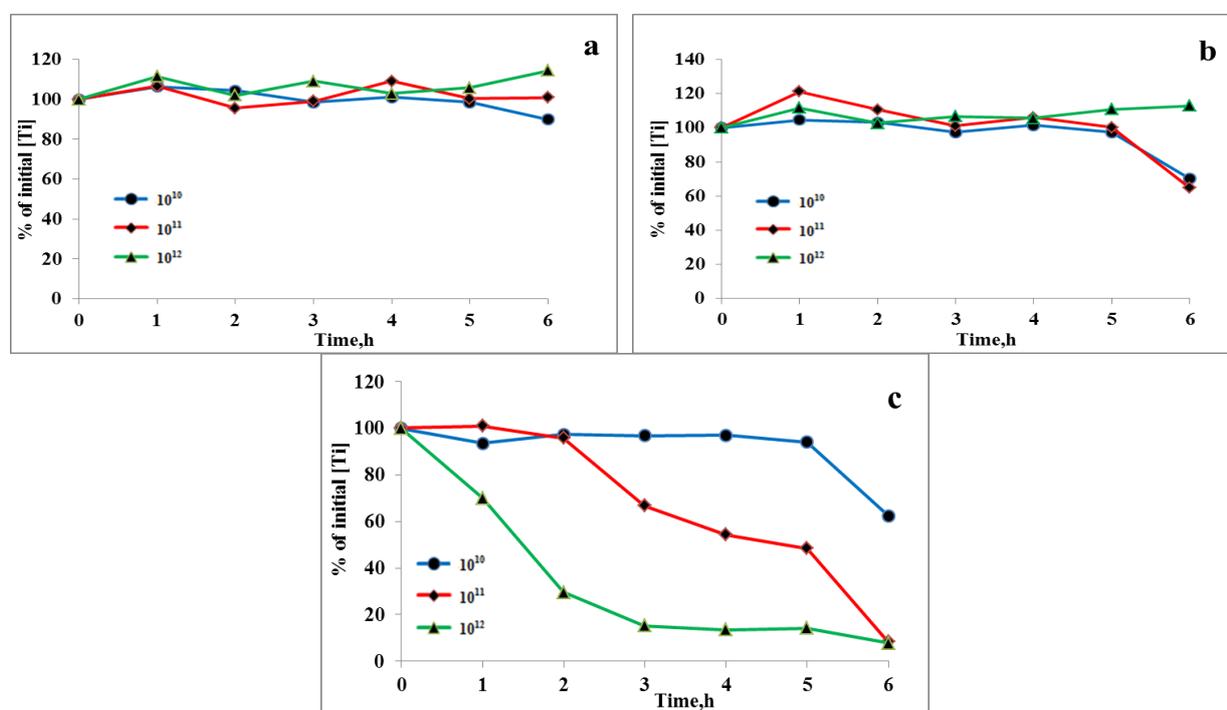
Figure A10. Comportement d'agglomération de nanoparticules de Ag (NM-300K) au pH de 8.5. (a) en présence de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 0, 1, 10 mM. (b) en présence de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 0, 1, 10 mM et 30 ppm de COD. À partir des données obtenues sur la stabilité dans différentes conditions, Ag est considéré comme un nanomatériau présentant une stabilité de dispersion élevée.

73. Les nanotubes de carbone testés (NM-400) n'étaient pas dispersibles, au vu des sédiments présents dans les tubes après la sonication. De plus, la formation immédiate (~ 10 min) d'une fraction déposée montrait que ce nanomatériau présente une faible stabilité de dispersion dans les conditions de l'essai. Il n'a donc pas été pratiqué d'essai étendu, et l'on ne dispose pas de graphiques illustrant la stabilité de dispersion des nanotubes de carbone.

Influence de la concentration des particules sur leur comportement d'agglomération

74. S'il est nécessaire d'étudier l'influence de la concentration numérique de particules sur leur stabilité de dispersion en dehors de la plage de concentrations retenue pour l'essai (voir le paragraphe 11), le protocole suivant est recommandé. La stabilité de dispersion de nanoparticules de TiO_2 (NM-105) a été étudiée à différentes concentrations : 10^{10} , 10^{11} et 10^{12} particules/l.

75. L'expérimentation a montré que dans des dispersions contenant des concentrations de Ca déstabilisantes, l'agglomération était plus rapide lorsque la concentration numérique de particules était plus élevée (figure A11 a, b et c).



Légende figure :

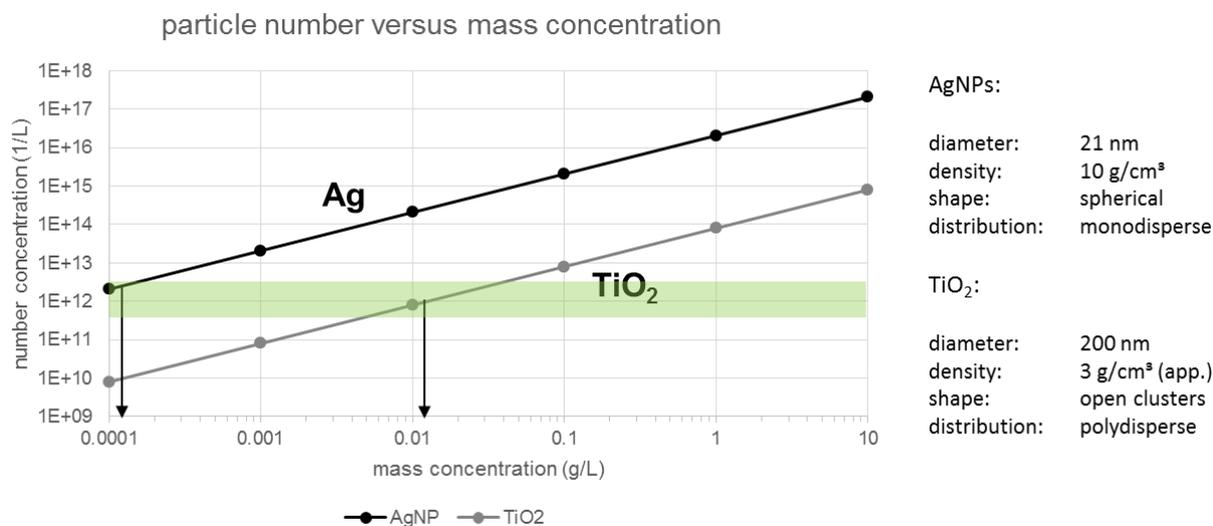
Time, h = Temps, h

% of initial = % de [Ti] initial

Figure A11. Stabilité de dispersion de particules de TiO_2 (NM-105) dans des dispersions de densité variable : 10^{11} , 10^{12} et 10^{13} particules/l. (a) dans un milieu MQ (b) avec $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 1 mM et (c) avec $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ à 5 mM.

76. Il est donc recommandé de préparer une dispersion présentant une concentration numérique de particules connue de l'ordre de 10^{12} particules/l. La concentration numérique de particules peut être calculée à partir de la taille et de la densité moyennes des particules. La taille moyenne des particules peut être établie par des mesures au moyen d'un dispositif DLS, en l'absence de données fournies par le fabricant ou issues d'une caractérisation préexistante. La plage de concentrations cible de 0.5×10^{12} à 5×10^{12}

particules/l ne nécessite pas un mesurage très précis. Il est suggéré d'utiliser le premier mode de la distribution en taille pondérée en intensité obtenue par DLS. Les distributions en taille fondées sur la masse et les tailles de particules moyennes correspondantes obtenues par fractionnement par couplage flux-force couplé à l'ICP-MS ou les distributions pondérées en intensité obtenues par fractionnement par couplage flux-force couplé à la DLS peuvent aussi être utilisées. Si des distributions en taille fondées sur le nombre de particules (établies par microscopie électronique) sont utilisées, elles doivent être converties en distributions fondées sur la masse et tailles moyennes de particules correspondantes. La polydispersion des matériaux, la forme des particules, la morphologie des agrégats et les variations de densité des particules par rapport à la densité du matériau sont autant de sources d'erreurs dans le calcul de la concentration numérique mais, comme indiqué plus haut, l'objectif est de parvenir à une plage relativement étendue de concentrations numériques.



Légende de la figure :

Particle number versus mass concentration = relation concentration numérique – concentration massique

Mass concentration (g/L) = concentration massique (g/l)

Number concentration (1/L) = concentration numérique (1/l)

Partie droite de la figure :

AgNP :

Diamètre : 21 nm

Densité : 10 g/cm³

Forme : sphérique

Distribution : monodispersée

TiO₂ :

Diamètre : 200 nm

Densité : 3 g/cm³

Forme : amas faiblement liés

Distribution : polydispersée

Figure A12. Exemples de concentrations massiques requises, pour différents types de nanomatériaux, pour que les concentrations numériques de particules se situent dans la plage de valeurs visée.

C. SUIVI EN CONTINU DU COMPORTEMENT D'AGGLOMÉRATION AU SPECTROPHOTOMÈTRE UV-VIS

77. La stabilité de dispersion de particules de TiO₂ (NM-105) a été suivie par spectroscopie UV-VIS. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (figures A13a et b et A14a et b). Ils font apparaître des relations de dépendance aux conditions expérimentales de même type que lors des mesures par ICP-OES et ICP-MS.

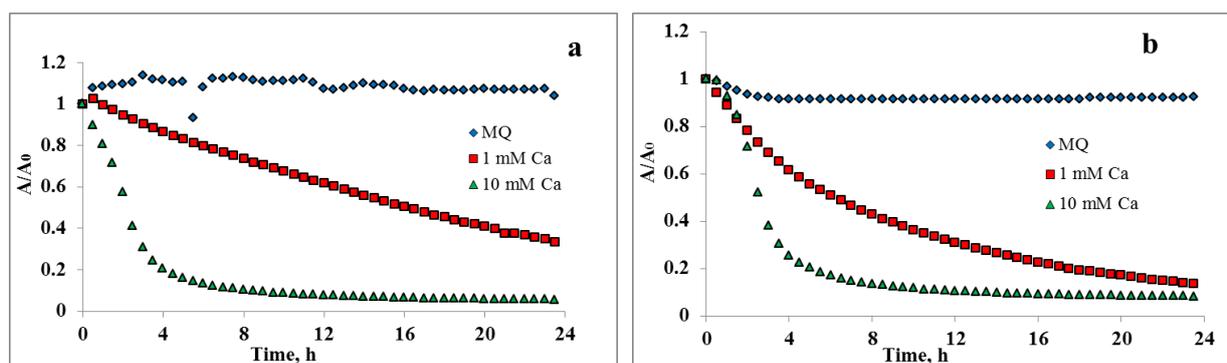


Figure A13. Stabilité de dispersion des particules de TiO₂ dans un milieu MQ. (a) longueur d'onde 380 nm, (b) longueur d'onde 600 nm.

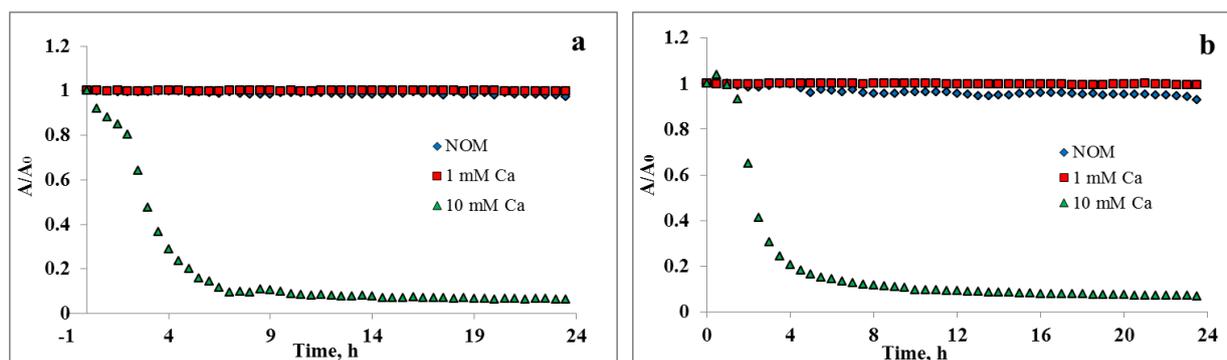


Figure A14. Stabilité de dispersion des particules de TiO₂ dans un milieu additionné de 30 ppm de MON. (a) longueur d'onde 380 nm, (b) longueur d'onde 600 nm.