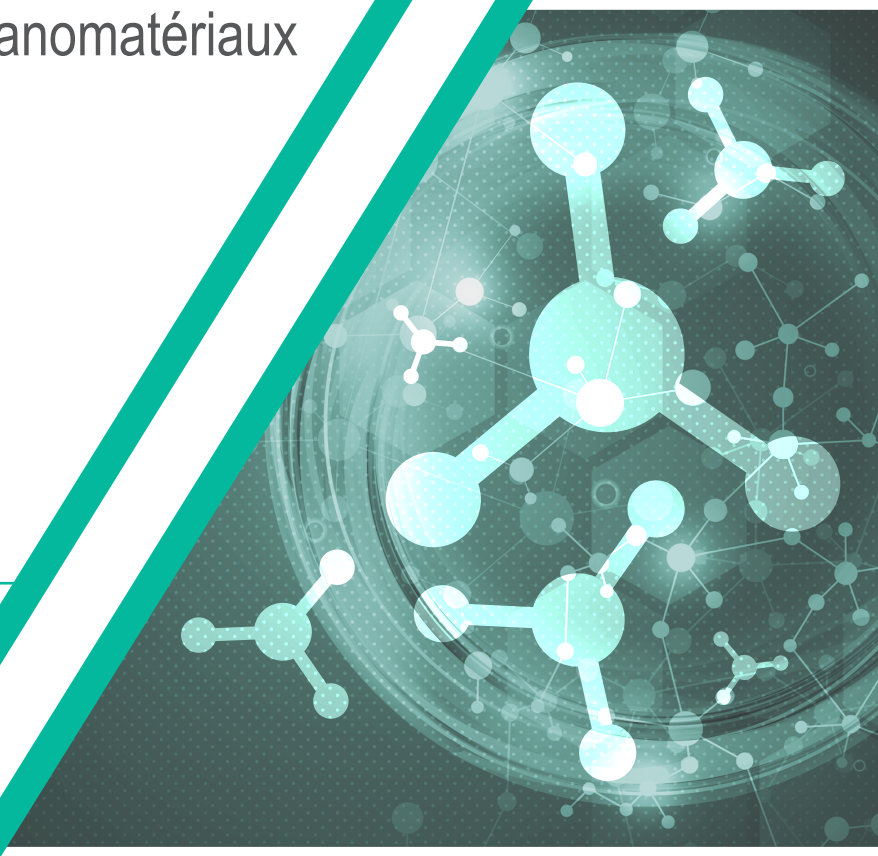
Section 1
Propriétés physico-chimiques

Essai n° 125:
Taille des particules et distribution granulométrique des nanomatériaux



4 juillet 2023

Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

OCDE
DES POLITIQUES MEILLEURES POUR UNE VIE MEILLEURE

OECD/OCDE 125

Adopteé :
30 juin 2022
Corrigée: le 4 juillet 2023

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

Taille des particules et distribution granulométrique des nanomatériaux

© OCDE (2023)
L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu aux conditions décrites sur le site: http://www.oecd.org/fr/conditionsdutilisation.

OECD/OCDE

125

Table de matières

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES 1

1 Introduction 3

2 Définitions 5

3 Portée, signification et utilisation 6

4 Remarques préliminaires et limites 8

5 Aspects relatifs à la préparation des échantillons 10

6 Partie spécifique : Particules 12

Remarques préliminaires et limites 12
Préparation des échantillons 13
Aperçu des méthodes et de leur applicabilité 13
Microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy) 19
Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS, Centrifugal Liquid Sedimentation)/ Ultracentrifugation analytique (AUC, Analytical Ultracentrifugation) 22
Système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS, *Differential Mobility Analysis System*) 26
Diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*) 29
Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*) 33
Analyse par traçage des particules (PTA, *Particle Tracking Analysis*) 38
Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*) 41

7 Partie spécifique : fibres 44

Remarques préliminaires et limites 44
Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*) 44

8 Matériaux recommandés pour la validation des essais 51

9 Rapport d'essai 52

10 BIBLIOGRAPHIE 58

© OCDE (2023)

1 Introduction

1. Le Groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés (GTNM) de l'OCDE a consacré de nombreux travaux à l'étude des questions de sécurité que peuvent poser les nanomatériaux manufacturés, et a largement contribué à résoudre ces questions en élaborant des Lignes directrice pour les essais (LD), des Documents guides, des Rapports d'essai et d'autres publications ayant trait à la sécurité dans l'emploi de ces matériaux. Pour plus d'informations, on pourra consulter le site web de l'OCDE (www.oecd.org/science/nanosafety) et les publications citées en référence [1-8].

2. Pour répondre aux besoins spécifiques des nanomatériaux manufacturés, il est apparu que la Ligne directrice pour les essais n° 110 de l'OCDE « Distribution de la taille des particules/distributions de la longueur et du diamètre des fibres » nécessitait une mise à jour. La version actuelle de la LD 110 (adoptée en 1981) n'est applicable qu'aux particules et aux fibres de taille supérieure à 250 nm. Le GTNM s'est fixé comme priorité soit de mettre à jour la LD 110 afin qu'elle s'applique également aux particules d'échelle nanométrique, soit de rédiger un nouveau projet de LD, spécifique des nanomatériaux.

3. Il a finalement été décidé d'élaborer une nouvelle LD couvrant la plage de 1 nm à 1000 nm, consacrée aux mesures de taille et de distribution granulométrique des particules de nanomatériaux. Le paragraphe 11 fournit des justifications supplémentaires sur la nécessité de ce type de mesures pour les nanomatériaux. La présente LD recoupe en partie la LD 110 pour les tailles comprises entre 250 nm et 1000 nm. Pour la mesure des matériaux particulaires ou fibreux, il convient de choisir la LD appropriée selon la granulométrie des particules soumises à l'essai. À l'instar de la LD 110, cette nouvelle LD relative aux nanomatériaux traite successivement des particules, puis des fibres.

4. Pour élaborer la partie consacrée aux particules, plusieurs méthodes applicables aux nanomatériaux ont été examinées afin de tenir compte des développements intervenus depuis l'adoption de la LD 110 en 1981. La présente ligne directrice comprend les méthodes suivantes : microscopie à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*), sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS, *Centrifugal Liquid Sedimentation*) /ultracentrifugation analytique (AUC, *Analytical Ultracentrifugation*), diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*), système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS, *Differential Mobility Analysis System*), analyse par traçage des (nano)particules (PTA/NTA, *(Nano)Particle Tracking Analysis*), diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*), microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique à transmission (MET). La méthode d'analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICP-MS, *Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) n'a pas pu être suffisamment validée dans le cadre de la comparaison interlaboratoire (CIL) des différentes méthodes présentées ici (voir aussi le paragraphe 7 pour plus de précisions sur la CIL). L'applicabilité de la sp-ICP-MS est strictement limitée aux nanomatériaux ayant une masse élevée associée à des particules suffisamment grandes. Toutefois, la méthode générale ICP-MS est largement utilisée, et le mode sp pour la mesure de taille de certains nanomatériaux a été appliqué avec succès lors de CIL réalisées dans un autre cadre. Cette méthode figure donc dans la partie C de l'Appendice à la présente LD, qui apporte d'autres précisions sur les limites de la méthode sp-ICP-MS.

© OCDE (2023)

5. Pour la mesure du diamètre et de la longueur des fibres, l'analyse d'images obtenues au microscope électronique est la seule méthode disponible actuellement. La présente LD inclut la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique à transmission (MET).

6. Pour tester la validité de la LD, une CIL a été réalisée. Les matériaux d'essai ont été choisis de façon à refléter une grande diversité de classes de nanomatériaux, incluant des métaux, oxydes métalliques, polymères et matériaux à base de carbone. On a utilisé dans la mesure du possible des matériaux d'essai bien caractérisés. De plus, les matériaux d'essai ont été choisis afin de couvrir une large gamme de tailles, représentative de la plage de 1 nm à 1000 nm. Pour les fibres, en particulier, les rapports d'aspect couvraient un large domaine (longueur/diamètre de 3 à > 50). Certains des matériaux d'essai utilisés sont disponibles dans le commerce, et on en trouvera les références dans le rapport de validation de la CIL [9].

7. La préparation des échantillons en vue de leur caractérisation physicochimique est délicate pour toutes les méthodes décrites. Compte tenu de la grande diversité des nanomatériaux et de leurs propriétés, il est impossible de proposer un protocole unique assurant une préparation optimale pour tout type de nanomatériau. Cette LD ne comporte donc pas de protocole générique pour la préparation des échantillons. Ce point est traité aux paragraphes 25-29, 33, 34 et 39 pour les particules et aux paragraphes 158 pour les fibres. On trouvera plus de précisions sur la préparation des échantillons de nanomatériaux en vue de leur caractérisation physicochimique dans le Document guide de l'OCDE sur la préparation d'échantillons et la dosimétrie pour les essais sur la sécurité des nanomatériaux [10], ainsi que dans d'autres sources ([11], par exemple).

8. D'autres informations contextuelles relatives à la présente LD ont été réunies dans le cadre de divers projets de recherche financés par des fonds publics, tels que le projet NanoDefine [11-13], financé par le 7e PC de l'UE.

© OCDE (2023)

2 Définitions

9. Les définitions et unités utilisées dans cette LD figurent à la partie A de l'Appendice. Il est rappelé que dans un contexte réglementaire, d'autres définitions peuvent s'appliquer au niveau national ou régional [14, 15]. Lorsque la mesure de nanomatériaux potentiels s'inscrit dans ce cadre, il est recommandé de consulter les instances chargées de la réglementation en la matière ou d'autres sources compétentes pour un avis spécifique.

10. Conformément aux définitions de l'ISO (voir l'Appendice, partie A), le terme « particule » s'applique dans la présente LD aux matériaux de forme sphérique ou pratiquement sphérique dont le rapport d'aspect est < 3, et le terme « fibre » aux matériaux fibreux dont le rapport d'aspect est ≥ 3. De plus, les termes « particule individuelle » et « fibre individuelle » sont utilisés pour les particules et fibres non liées (ni agglomérées ni agrégées). Le terme « élément constituant » est utilisé dans cette LD pour décrire les structures (particules ou fibres) présentes au sein des agglomérats et des agrégats, constituées par exemple de particules ou de fibres individuelles sous leur forme initiale.

© OCDE (2023)

3 Portée, signification et utilisation

11. Les nanomatériaux sont des formes spécifiques de substances chimiques et sont donc couverts par la législation sur les produits chimiques, dans les pays membres de l'OCDE. Les exigences réglementaires peuvent inclure l'obligation d'information sur leurs propriétés intrinsèques et/ou leur identité. Des informations sur la taille et la distribution granulométrique des particules sont généralement nécessaires pour identifier un nanomatériau en tant que tel. La taille et la granulométrie des particules peuvent aussi faire partie d'une caractérisation physicochimique générale préalable à l'évaluation réglementaire des risques liés aux nanomatériaux [16, 17]. Dans cette LD, les recommandations (relatives à la préparation des échantillons, notamment) privilégient la mesure des propriétés intrinsèques liées à la taille des particules. Il peut être nécessaire d'adapter ces recommandations pour répondre à d'autres objectifs en matière d'évaluation des risques.

12. Cette LD traite des méthodes de détermination de la taille et de la granulométrie des particules et des fibres à l'échelle nanométrique. Elle comprend deux parties décrivant les méthodes applicables aux particules, d'une part, et aux fibres, d'autre part. On trouvera des indications plus précises sur l'applicabilité aux particules et aux fibres aux paragraphes 15-17 et 18-19, respectivement.

13. La LD couvre les particules et leurs agglomérats/agrégats de taille comprise entre $d{\sim}1$ nm et $d{\sim}1000$ nm, où *d* est le diamètre des particules. Dans le présent document, *d* sera utilisé pour désigner la taille des particules. La LD s'applique en outre aux fibres individuelles et à leurs agglomérats de diamètre compris entre $x_d{\sim}1$ nm et $x_d{\sim}1000$ nm, et de longueur $x_l \leq 20$ µm (d'une manière générale – pour les limites, voir les paragraphes 18 et 163. Dans le présent document, *x* sera utilisé pour désigner la taille des fibres, avec les indices *d* pour leur diamètre et *l* pour leur longueur. La gamme de tailles est choisie de façon à couvrir toute la distribution granulométrique des nanomatériaux. La limite supérieure de 1000 nm permet un chevauchement avec la plage de mesure de la LD 110.

14. Les méthodes décrites dans cette LD sont applicables à la mesure des particules sphériques ou pratiquement sphériques (rapport d'aspect moyen < 3) de taille inférieure à 1000 nm. Seules certaines de ces méthodes permettent la mesure des particules non sphériques (rapport d'aspect moyen ≥ 3), c'est-à-dire des fibres (voir le paragraphe 18. Les particules non sphériques peuvent prendre une orientation particulière lors du mesurage, ce qui peut avoir une incidence sur la distribution granulométrique obtenue. Les approches destinées à corriger ce type d'effet ne relèvent pas du champ de la présente LD et sont traitées ailleurs [18-20]. On notera que la taille est une grandeur (ou un mesurande) qui dépend de la méthode de mesure ; des méthodes différentes donnent par conséquent divers types de diamètres, qui peuvent aussi dépendre du matériau et de la morphologie des particules mesurées. Les matériaux nanostructurés qui ne sont pas basés sur des nano-objets, tels que les structures de surface à l'échelle nanométrique ou les matériaux bidimensionnels, ne relèvent pas de cette LD.

15. Cette LD est validée pour la mesure de taille et de distribution granulométrique des particules individuelles, agglomérats et agrégats dans un système dispersé de façon optimale pour l'objectif recherché, obtenu par une préparation minutieuse des échantillons (voir le paragraphe 25 [9]).

© OCDE (2023)

16. Les mélanges de particules constituées de substances différentes peuvent être mesurés par des méthodes spécifiques. Il est difficile de faire la distinction entre les distributions granulométriques des différents matériaux, mais on peut éventuellement y parvenir en combinant différentes techniques, par exemple en associant la microscopie électronique (ME) à la spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDXS, *Energy Dispersive X-ray spectroscopy*) [21, 22].

17. Cette LD expose comment déterminer la distribution granulométrique des particules de 1 nm à 1000 nm par les méthodes suivantes :

- Microscopie à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*)
- Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS, *Centrifugal Liquid Sedimentation*)/Ultracentrifugation analytique (AUC, *Analytical Ultracentrifugation*)
- Système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS, *Differential Mobility Analysis System*)
- Diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*)
- Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*)
- Analyse par traçage des particules (PTA, *Particle Tracking Analysis*)
- Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*)

En outre, la méthode d'analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICP-MS), bien qu'elle n'ait pas été suffisamment validée lors de la CIL, est décrite à la partie C de l'Appendice, voir aussi le paragraphe 4. À titre d'information générale sur l'applicabilité des méthodes, le Tableau 1 donne un bref aperçu des mesurandes et des principales limites de chaque méthode.

18. Cette LD indique comment utiliser les techniques de microscopie électronique à transmission (MET) et de microscopie électronique à balayage (MEB) pour déterminer par paires de descripteurs le diamètre et la longueur des fibres (ce qui implique de mesurer la longueur et le diamètre de chaque fibre individuelle), et comment compiler les distributions en nombre des longueurs et des diamètres des matériaux fibreux. La MET et la MEB sont considérées comme les deux seules méthodes applicables pour établir ces données. L'AFM permettrait de déterminer le diamètre des fibres individuelles, mais n'est pas mentionnée dans ce chapitre, car elle ne permet pas la mesure par paire du diamètre et de la longueur. Une limite s'applique à la MET, car cette méthode s'est révélée moins fiable dans le cas des fibres présentant une longueur médiane > 5 µm et une grande dispersion des longueurs, voir le paragraphe 21. Les marges d'erreur déterminées dans le cadre de la CIL ont été considérées comme non acceptables. Pour plus de précisions, on consultera le Rapport de validation [9].

19. Cette LD définit la détermination par paire du diamètre et de la longueur des fibres individuelles comme nouveau protocole normalisé. Seule la mesure par paire permet la compilation de données de distribution du diamètre rapporté à la longueur, indispensable pour quantifier les fractions potentiellement dangereuses des ensembles de fibres. Cette détermination par paire est d'une grande importance pour une évaluation fiable des risques dans les études toxicologiques et épidémiologiques. Si le diamètre conditionne la respirabilité d'une fibre, sa longueur est considérée comme déterminante pour ce qui est de sa capacité à être éliminée des poumons via la phagocytose par les macrophages [2, 23].

© OCDE (2023)

4 Remarques préliminaires et limites

20. Le résultat de mesure de la taille des particules est consigné sous la forme d'un diamètre sphérique équivalent, qui dépend du principe de mesure (diamètre aérodynamique, diamètre basé sur la mobilité électrique, sur la diffusion de la lumière, par exemple), ou d'un diamètre circulaire équivalent pour les méthodes par microscopie. Le diamètre équivalent mesuré est également influencé par la préparation de l'échantillon, la démarche d'analyse des données, la pondération de la distribution et le type de moyennage appliqué [18]. Les méthodes peuvent aussi fournir d'autres diamètres, tels que les diamètres minimal et maximal de Féret, voir par exemple in [13, 19, 24].

21. Une population de particules ou de fibres est caractérisée par sa distribution granulométrique et par l'écart type géométrique σ_g de cette distribution. Selon la méthode de mesure, la distribution granulométrique obtenue pour les particules est déterminée d'après les nombres de particules, l'aire de surface équivalente, le volume équivalent, ou encore d'après l'intensité ou l'extinction d'un signal de mesure (arbitraire) moyen, établie en mesurant un grand nombre de particules simultanément. La distribution granulométrique des fibres est représentée par une fonction du nombre de fibres analysées et, par exemple, de leur diamètre et de leur longueur moyens, médians et modaux. Pour les distributions granulométriques de particules ou de fibres présentant plusieurs maximums locaux, les valeurs caractéristiques de chaque maximum local doivent être déterminées. L'écart type géométrique des particules et des fibres mesurées est établi dans l'hypothèse d'une distribution de taille log-normale. Cette variable permet notamment de caractériser la largeur de la distribution granulométrique d'un matériau, selon les définitions suivantes [19] :

1. la distribution granulométrique d'un matériau est dite étroite lorsque $\sigma_g \leq 1.5$
2. la distribution granulométrique d'un matériau est dite large lorsque $\sigma_g > 1.5$

   Ces valeurs sont calculées d'après la norme ISO 13322-1 [20], compte tenu des indications des normes ISO 19749 et ISO 21363 [19, 24] relatives aux limites d'erreur et au nombre de particules comptées.

22. Les grandeurs utilisées pour la distribution granulométrique – nombre de particules, surface, volume, masse ou intensité du signal – dépendent du principe physique de la méthode employée. Elles sont signalées par l'indice r [25, 26] : nombre : $r = 0$; longueur : r = 1 ; surface : $r = 2$; volume/masse : $r = 3$; intensité : r = i.

Exemple : la désignation complète du diamètre hydrodynamique d'une distribution granulométrique en nombre de particules, mesurée par PTA, est $\mathrm{d}_{0,\mathrm{hyd}}$. *Le* ***Tableau 1*** *donne un aperçu des différentes grandeurs et des indices correspondants pour chaque méthode de mesure du diamètre.*

23. Si l'on compare les résultats de mesure de la taille des particules selon le principe physique utilisé (voir le paragraphe 22, les tailles obtenues suivent la tendance suivante : $\mathrm{d}_0 < \mathrm{d}_2 < \mathrm{d}_3$ [20, 26-29]. La transformation mathématique d'une mesure de distribution granulométrique en une autre est possible dans des conditions très spécifiques (par exemple pour des particules parfaitement sphériques et monodispersées). Dans la plupart des autres cas, la transformation mathématique fait appel à des hypothèses induisant des incertitudes inconnues. Ce type de

© OCDE (2023)

transformation n'est donc pas recommandé, en règle générale. Pour plus d'informations sur la transformation mathématique des distributions granulométriques, voir *[25, 30, 31].*

24. Cette LD traite des mesures de taille dans la gamme de 1 nm à 1000 nm. Toutefois, chaque méthode et instrument correspondant a sa propre plage de mesure. En outre, le nanomatériau à analyser peut influer sur la plage de mesure applicable, du fait par exemple de problèmes de contraste en microscopie électronique. C'est pourquoi il peut être nécessaire de combiner plusieurs méthodes, pour couvrir toute la plage de tailles. Qui plus est, la plupart des nanomatériaux réels ne peuvent être caractérisés que par un petit nombre de méthodes, et rares sont ceux qui peuvent être caractérisés correctement par toutes les méthodes. Il est donc instamment recommandé de prêter attention aux limites et à l'applicabilité de chaque méthode, avant de décider de la méthode optimale pour l'analyse d'un nanomatériau potentiel. L'étalonnage des méthodes doit être réalisé avec des matériaux de référence dûment certifiés pour la méthode et le mesurande considérés. Afin de bénéficier du développement d'algorithmes nouveaux ou améliorés pour l'évaluation des résultats de mesure bruts, il est recommandé d'utiliser les versions les plus récentes des logiciels.

© OCDE (2023)

5 Aspects relatifs à la préparation des échantillons

25. La LD peut être appliquée à divers types d'échantillons, préparés par différentes voies :

a à partir de poudre sèche

b à partir d'une suspension

c à partir d'un aérosol

Notons qu'il est souhaitable de tester plusieurs possibilités, ou même les trois, afin d'évaluer la reproductibilité et la robustesse de la préparation des échantillons. Le choix des voies à tester pourra être guidé par l'objectif des mesures de taille et le matériau d'intérêt.

26. Les dispersions de particules dans des gaz ou des liquides doivent être physiquement et chimiquement stables (dans le temps), comme indiqué aux paragraphes 28 et 29, pour que les mesures soient reproductibles et représentatives. Comme les nanomatériaux peuvent avoir tendance à l'agglomération, la dissolution ou l'interaction avec les composés du milieu, un soin particulier doit être apporté à la préparation des échantillons [32]. Il est recommandé de réunir au préalable des connaissances sur la dissolution et les interactions avec les constituants du milieu, en particulier sur leur rôle dans la stabilité de la dispersion.

27. Les matériaux d'essai considérés doivent également être stables lors du mesurage et dans toutes les conditions de mise en œuvre de la technique de mesure utilisée. Cela peut inclure :

a la stabilité sous vide (MEB, MET, par exemple)

b la stabilité sous un faisceau d'électrons (MEB, MET, par exemple)

c la stabilité à la déformation (AFM, par exemple)

Il est recommandé de réunir au préalable des connaissances sur ces paramètres.

28. La préparation des échantillons a une incidence majeure sur les mesures de taille des particules et des fibres et les statistiques de distribution. Il est impératif de décrire en détails dans le rapport toutes les étapes de préparation, voir le paragraphe 176. Les échantillons doivent être préparés avec le plus grand soin, afin que les résultats obtenus répondent à l'objectif et présentent une reproductibilité élevée sans biais significatifs. Pour cela, on veillera notamment aux points suivants :

a L'échantillonnage doit être approprié, statistiquement représentatif de la distribution granulométrique réelle. L'échantillon doit rester homogène pour ce qui de sa distribution granulométrique. Tout fractionnement par taille doit être évité. Il importe de procéder à un échantillonnage représentatif et de tester la stabilité temporelle et l'homogénéité spatiale de la préparation en prélevant des sous-échantillons à plusieurs intervalles de temps et à différents emplacements de la préparation [33, 34]. On trouvera des indications complémentaires sur l'échantillonnage in [25, 31, 33-36].

b Une préparation inadéquate des échantillons peut modifier la taille ou la distribution granulométrique, du fait par exemple de cassures des matériaux d'essai consécutives à

© OCDE (2023)

un apport d'énergie excessif, de la perte des fractions plus petites de l'échantillon liée au choix de filtres poreux ayant des pores trop larges, de la dissolution du matériau d'essai dans le milieu d'essai ou d'un désassemblage insuffisant des agglomérats (sous-broyage) (voir la norme ISO 14887 [37]).

c La quantité de matériau sur- ou sous-broyé peut être estimée par une méthode de microscopie électronique. La norme ISO 14887 fournit des indications d'ordre général, non spécifiques des nanomatériaux, sur la façon de quantifier les matériaux trop ou insuffisamment broyés, et recommande de respecter une limite fixée à 5 % de la concentration en nombre.

d *Limites de concentration. La concentration de l'échantillon final doit être compatible avec les exigences de la méthode de mesure choisie.*

e Sédimentation des particules. Lorsque les matériaux d'essai et leurs agglomérats sédimentent rapidement, il importe de les manipuler de façon à limiter l'incidence de leur sédimentation sur la distribution granulométrique des particules submicrométriques.

f Grosses particules. Les particules de diamètre > 1000 nm peuvent être soit retirées avant la mesure, soit exclues de l'évaluation des résultats. Il convient d'évaluer et d'indiquer dans le rapport dans quelle mesure le retrait des grosses particules influe sur la distribution granulométrique des particules dispersées restantes.

g Selon l'objectif poursuivi, des exigences particulières (légales, par exemple) peuvent spécifier quelles sont les particules de l'échantillon qui doivent être évaluées, à savoir une ou plusieurs particules individuelles, ou des agglomérats et/ou agrégats, ou leurs éléments constituants ; il peut aussi être demandé d'établir une distinction entre ces différentes catégories de particules. Cela peut avoir une incidence sur le mode de préparation des échantillons.

Signalons que dans certains cas, l'objectif du mesurage, et/ou les propriétés du matériau d'essai, peuvent s'opposer à la formation de toute dispersion stable.

29. En règle générale, pour toutes les méthodes de mesure, il est nécessaire de disposer d'un protocole de préparation des échantillons établi avec précision, conformément aux BPL, pour chaque matériau d'essai. En raison des différences entre nanomatériaux et du large spectre de propriétés qu'ils peuvent présenter, il n'est pas possible de définir ici un protocole général assurant une préparation optimale des échantillons pour tout type de nanomatériau. La présente LD définit en revanche des critères de qualité pour la préparation des échantillons de particules (paragraphes 33-34 et de fibres (paragraphes 162-164. Pour chaque nanomatériau potentiel étudié, un protocole spécifique de préparation des échantillons doit être élaboré et testé eu égard à ces critères de qualité. Une série de protocoles et de normes existants peuvent être utilisés comme points de départ [11, 33-35, 37].

© OCDE (2023)

6 Partie spécifique : Particules

Remarques préliminaires et limites

30. La taille des particules des matériaux particulaires peut être déterminée à partir de divers mesurandes.

a Certains mesurandes de la taille des particules reposent sur l'hypothèse d'une forme sphérique. Le diamètre est alors exprimé comme celui d'une sphère équivalente ou celui d'un cercle d'une aire équivalente.

b Chaque méthode mesure une propriété physique spécifique, à partir de laquelle un diamètre est calculé sur la base de l'unité de longueur. Les diamètres obtenus peuvent présenter des différences significatives, selon les principes physiques sur lesquels reposent les méthodes de mesure et le mode de pondération des résultats.

Ainsi, les diamètres hydrodynamiques établis par DLS seront normalement plus grands que le diamètre circulaire équivalent issu de l'analyse par MET, car la première de ces deux méthodes mesure la taille de la particule en y incluant l'enveloppe de solvant qui l'entoure, tandis que la seconde mesure le diamètre du cercle projeté par la particule sèche (dans l'hypothèse où le mode de pondération est identique pour ces deux valeurs).

c La taille des particules est désignée par le symbole *d* pour le diamètre équivalent des particules.

d Un indice est utilisé pour préciser de quel type de diamètre il s'agit.

Les indices correspondants aux méthodes décrites dans cette LD sont les suivants : diamètre hydrodynamique d_{hyd}*, diamètre circulaire équivalent* d_{ecd}*, diamètre de Stokes* d_{St}*, diamètre établi d'après la mobilité électrique* d_{emob}*, diamètre sphérique équivalent en masse* d_{mass}*, diamètre établi d'après l'intensité de la lumière diffusée* d_{Iscat}*, diamètre basé sur la hauteur des particules* d_{hgt}*.*

31. Il est difficile de discriminer les particules individuelles des agrégats et agglomérats, en particulier si l'on n'utilise pas de méthode d'imagerie.

a En l'absence de connaissances préalables sur la taille et l'état de dispersion des particules, il convient d'appliquer une technique de microscopie électronique avec un grossissement suffisant pour l'identification des agglomérats/agrégats, au moins pour un examen qualitatif de l'échantillon. Il est recommandé de compléter l'imagerie électronique par une autre méthode permettant de mesurer un grand nombre de particules (> 4000) afin d'établir leur distribution granulométrique [19, 38]. Les matériaux nanostructurés qui ne sont pas basés sur des nano-objets, tels que les structures de surface à l'échelle nanométrique, ne relèvent pas de cette LD.

b Lorsque l'on dispose de connaissances préalables, par exemple sur la taille et l'état de dispersion du matériau d'essai, il est possible qu'une technique d'imagerie ne soit pas

© OCDE (2023)

nécessaire, si les résultats obtenus par d'autres techniques correspondent aux valeurs attendues (matériaux de référence certifiés (MRC), contrôle de la qualité des matériaux, par exemple). Les connaissances préalables peuvent inclure une valeur attendue pour la taille et la forme des particules considérées, ou des indications sur leur tendance à s'agglomérer et/ou à s'agréger lors de leur fabrication ou de la préparation des échantillons.

c Dans tous les cas, il est recommandé d'appliquer deux méthodes reposant sur des principes de mesure indépendants, afin de s'assurer de la cohérence des résultats.

32. Aucune technique de mesure ne couvre à elle seule toute la gamme des matériaux disponibles. Cette LD comprend huit techniques permettant de mesurer la taille des particules et de compiler les distributions granulométriques des matériaux à l'échelle submicronique. Il est important de choisir la ou les technique(s) appropriée(s). Les mesurandes et les plages d'applicabilité sont indiqués au paragraphe 35.

Préparation des échantillons

33. La stabilité à long terme des dispersions est fortement influencée par les propriétés du matériau d'essai et le milieu de dispersion. Pour une mesure fiable de la taille des particules et de leur distribution granulométrique, la dispersion préparée doit rester stable jusqu'à la fin du mesurage. Les particules doivent être distribuées de manière homogène dans tout le volume de l'échantillon. Elles ne doivent pas sédimenter, s'agglomérer ou se dissoudre de façon significative pendant cette période de temps. Elles doivent être bien séparées, et ne présenter que peu ou pas d'impuretés interférant avec la grandeur à mesurer. Si une perte de stabilité de la dispersion survient, elle n'est acceptable que dans la mesure où elle reste compatible avec les exigences de la méthode employée et l'objectif du mesurage.

34. Lorsque l'objectif du mesurage est d'établir la distribution granulométrique de particules individuelles, une qualité de dispersion spécifique est requise. La qualité peut être contrôlée lors de la préparation des échantillons, en pratiquant par exemple des mesures répétées par la même méthode au cours de la procédure de sonication de l'échantillon jusqu'à ce qu'une dispersion stable soit atteinte. Pour un tel objectif, la qualité de la dispersion doit répondre à l'un des critères suivants, dans le respect des exigences de la méthode (voir le paragraphe 35.

a) La dispersion contient exclusivement des particules individuelles, ou
b) La dispersion contient des particules individuelles et des agrégats, ainsi qu'un petit nombre d'agglomérats (un pourcentage inférieur à 5 % de la concentration en nombre de particules et d'agrégats est recommandé, voir le paragraphe **Error! Reference source not found.**.

Aperçu des méthodes et de leur applicabilité

35. Plusieurs méthodes permettent en principe de déterminer la taille et la distribution granulométrique des matériaux particulaires. Chacune d'elles est applicable à une plage de tailles de particules, et présente des limites d'ordre technique ou liées aux matériaux. Le ***Tableau 1*** donne un aperçu de ces méthodes et indique la plage de tailles de particules à laquelle elles s'appliquent, le mesurande, le type de grandeur correspondant pour la distribution, les milieux appropriés et les avantages/limites de chaque méthode. On trouvera plus d'informations sur la plupart d'entre elles in [12, 13, 22, 39, 40], par exemple.

© OCDE (2023)

36. Le ***tableau 2*** donne un aperçu de l'applicabilité et des performances des méthodes. Chacune d'elles est décrite en détails dans les paragraphes suivants. À des fins de correspondance entre les versions anglaise et française de la présente ligne directrice, les méthodes sont listées dans l'ordre alphabétique des termes anglophones (indiqués entre parenthèses après chaque intertitre).

© OCDE (2023)

1 *Tableau 1 : Aperçu des méthodes applicables aux particules dont le rapport d'aspect est < 3*

Méthode	**Plage de tailles* (d en nm)**	**Type de grandeur et indice du diamètre****	**Type de diamètre*****	**Principe de mesure**	**Type d'échantillon et de milieu**
Microscopie à force atomique (AFM, *Atomic Force Microscopy*)	1-1000	$d_{0,hgt}$	Diamètre circulaire équivalent basé sur la hauteur	Hauteur	Particules déposées
Sédimentation par centrifugation en phase liquide/ Ultracentrifugation analytique (CLS/AUC, *Centrifugal Liquid sedimentation*/*Analytical Ultracentrifugation*)	10-1000	$d_{3,St}$, $d_{i,St}$	Diamètre sphérique équivalent de Stokes	Dépendant du détecteur	Dispersion
Système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS, *Differential Mobility Analysis System*)	2-1000	$d_{0,emob}$	Diamètre sphérique équivalent basé sur la mobilité électrique	Mobilité électrique	Aérosol
Diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*)	1-1000	$d_{i,hyd}$	Diamètre sphérique équivalent hydrodynamique	Diffusion de la lumière résolue en temps	Dispersion
Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*)	1-1000	$d_{0,ecd}$	Diamètre circulaire équivalent	Projection (MET) et imagerie des électrons du signal (MEB)	Vide, particules sèches déposées

© OCDE (2023)

Analyse par traçage des particules (PTA, *Particle Tracking Analysis*)	10-1000	$d_{0,hyd}$	Diamètre sphérique équivalent hydrodynamique	Diffusion	Dispersion
Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*)	1-200	$d_{3,Iscat}$	Diamètre équivalent basé sur le carré du volume	Intensité de la lumière diffusée	Dispersion, poudre
Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif *(sp-ICP-MS , Single particle Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry)*****	*10-1000*	$d_{0,mass}$	*Diamètre sphérique équivalent d'après la concentration massique*	*Concentration massique*	*Dispersion*

* Note : les plages indiquées correspondent aux tailles qu'il est possible de mesurer à l'intérieur de la plage de taille de 1 à 1000 nm couverte par cette LD. Les limites, en particulier la limite de taille inférieure, sont précisées dans les paragraphes de la LD consacrés aux différentes méthodes.

** Note : voir les paragraphes 22 et 30 pour les indices

*** Note : d'autres diamètres pertinents peuvent être obtenus par certaines de ces méthodes, tels que le diamètre minimal/maximal de Féret ($d_{0,Fmin}$; $d_{0,Fmax}$) pour la ME, mais n'ont pas été repris ici pour ne pas surcharger le tableau .

**** Note : la méthode sp-ICP-MS est présentée à la partie C de l'Appendice. Les données de la littérature montrent que cette méthode pourrait être valide pour générer des résultats fiables, robustes et reproductibles, mais il n'a pas été possible, dans le cadre de l'élaboration de cette LD, de procéder à une validation complète pour ce qui est de la cohérence et de la comparabilité des résultats et de leur dépendance vis-à-vis des instruments de mesure.

© OCDE (2023)

Tableau 2 :Applicabilité et performances des méthodes

Méthode applicable …	**AFM**	**CLS/AUC**	**DLS**	**DMAS**	**PTA**	**SAXS**	**ME**	***sp-ICP-MS****
pour obtenir directement une distribution granulométrique en nombre de particules	O	N	N	O	O	N	O	*O*
pour mesurer un grand nombre de particules **	10^3	10^5	10^5	10^5	10^3	10^5	10^3	*10^3*
pour déterminer le diamètre extérieur	O	O	O	O	O	C	C	*N*
pour distinguer les particules individuelles des agglomérats/agrégats	C	C	N	C	N	C	O	*C*
lorsque la distribution granulométrique doit avoir une bonne résolution	C	O	N	O	C	O	C	*O*
pour les mélanges de différentes particules	N	C	N	O	C	C	O	*C*
pour les particules constituées de plusieurs substances	O	N	N	O	C	C	O	*C*
Performances de la méthode :	**AFM**	**CLS/AUC**	**DLS**	**DMAS**	**PTA**	**SAXS**	**ME**	***sp-ICP-MS****
Tend à sous-estimer les diamètres (voir le paragraphe 37	O	N	N	N	N	O	O	*O*
Tend à surestimer les diamètres (voir le paragraphe 37	N	N	O	O	O	N	N	*N*
Fiable pour l'obtention du diamètre modal ***	O	C	N	O	C	O	O	*O*
Permet d'obtenir le diamètre circulaire équivalent (voir le paragraphe 38	O	N	N	O	N	O	O	*O*
Permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique (voir le paragraphe 38	N	O	O	N	O	N	N	*N*

C = selon les cas
O = Oui
N= Non

**Note : la méthode sp-ICP-MS est présentée à la Partie C de l'Appendice. Les données de la littérature montrent que cette méthode pourrait être valide pour générer des résultats fiables, robustes et reproductibles, mais il n'a pas été possible, dans le cadre de l'élaboration de cette LD, de procéder à une validation complète pour ce qui est de la cohérence et de la comparabilité des résultats et de leur dépendnce vis-à-vis des instruments de mesure.*

*** Les chiffres représentent une approximation grossière de l'ordre de grandeur.*

**** Diamètre d'un mode, dans une distribution granulométrique multimodale.*

Note : Ces tableaux donnent une image idéalisée de la situation. Certains cas peuvent ne pas correspondre à cette image.

© OCDE (2023)

37. Surestimation et sous-estimation

a L'AFM peut sous-estimer la hauteur d'une particule du fait de la compression de la particule liée à la force appliquée lors de l'imagerie [41]. La méthode SAXS peut sous-estimer le diamètre si le matériau d'essai porte un revêtement ayant une capacité de diffusion très faible ou nulle. La MEB et la MET peuvent sous-estimer le diamètre du fait d'une rétraction des particules soumises au vide, et de problèmes de contraste dus aux revêtements des matériaux. Si une méthode tend à sous-estimer la taille, il peut être utile d'évaluer si les particules sont plus grandes qu'une valeur définie. (Cela peut être suffisant pour déterminer qu'un matériau d'essai n'est pas un nanomatériau. Par exemple lorsque la distribution granulométrique établit le diamètre moyen ou médian mesuré à 100 nm. Dans le cas où la méthode utilisée est connue pour sous-estimer la taille des particules, on peut raisonnablement penser que la valeur réelle sera plutôt supérieure qu'inférieure à 100 nm (120 nm, par exemple). On peut en conclure que le matériau n'est probablement pas un nanomatériau, ce que devront confirmer des mesures complémentaires par une seconde méthode).

b La DLS et la PTA peuvent surestimer le diamètre, car l'intensité de diffusion plus élevée des particules plus grandes va occulter les plus petites particules, le DMAS peut surestimer le diamètre en raison de la production d'aérosol à partir de liquides. Si une méthode tend à surestimer la taille et qu'une taille de particule supérieure à une valeur définie (100 nm, par exemple) est mesurée, il peut être utile d'évaluer si les particules sont plus petites que la valeur définie. (Cela peut être suffisant pour déterminer qu'un matériau d'essai n'est pas un nanomatériau. Par exemple lorsque la distribution granulométrique établit le diamètre moyen ou médian mesuré à 100 nm. Dans le cas où la méthode utilisée est connue pour surestimer la taille des particules, on peut raisonnablement penser que la valeur réelle sera plutôt inférieure que supérieure à 100 nm (80 nm, par exemple). On peut en conclure que le matériau est probablement un nanomatériau, ce que devront confirmer des mesures complémentaires par une seconde méthode).

38. Les valeurs consignées dans le rapport doivent provenir, de préférence, de mesures directes.

a Le diamètre circulaire équivalent peut être obtenu par les méthodes d'imagerie et par SAXS/DMAS, si les particules sont pratiquement sphériques. Les diamètres de particules incluant une couche sèche de fonctionnalisation (diamètre extérieur, selon les définitions) peuvent être établis par DMAS directement, et par les méthodes d'imagerie si les particules sont pratiquement sphériques.

b Plusieurs types de diamètres dérivés de l'imagerie peuvent être obtenus par microscopie électronique. C'est le cas des diamètres minimal et maximal de Féret, qui peuvent être utiles si les particules ne sont pas idéalement sphériques (rapport d'aspect > 1).

c Le diamètre sphérique équivalent hydrodynamique peut être obtenu par trois méthodes de mesure en phase liquide : CLS, DLS et PTA.

Différents diamètres (hydrodynamique, de Stokes, etc.) peuvent en principe être calculés à partir d'une donnée mesurée, mais ce type de calcul est déconseillé, car il augmente les incertitudes sur les valeurs obtenues. Si l'on y recourt malgré tout, il importe d'indiquer dans le rapport tant les valeurs mesurées que les valeurs calculées, en précisant le mode de calcul utilisé.

39. Il convient de tenir compte des éléments suivants pour le choix d'une méthode de mesure et d'une démarche d'analyse des données appropriées.

© OCDE (2023)

a Milieu et méthode de préparation idoines pour la mesure des particules – type de milieu, poudre, aérosol ou dispersion dans un liquide.

b Données requises : diamètre des particules types dans le milieu.

i. En l'absence de connaissances préalables sur la taille et l'état de dispersion des particules, une technique de microscopie électronique doit être appliquée pour obtenir une première impression du matériau d'essai.

c Type de grandeur à établir pour la distribution granulométrique, qui sera basée sur le nombre, la masse ou le volume, par exemple.

d Plage de taille des particules étudiées : choisir une méthode couvrant l'intégralité de la plage, compte tenu notamment de la plage de taille dynamique de la technique, c'est-à-dire des différents réglages de l'instrument.

e S'il faut mesurer un mélange de particules constituées de différents substances (50 % de particules A et 50 % de particules B, par exemple), il convient d'examiner attentivement l'incidence des différentes propriétés de chaque type de particules eu égard à la technique de mesure de la taille, au mode de détection, à la pondération résultante et à l'objectif de l'essai. Les méthodes DLS, CLS et PTA, par exemple, donneront des distributions granulométriques basées sur les diamètres équivalents sans distinction entre les différentes fractions de particules. D'une manière générale, il est difficile de distinguer les distributions granulométriques de différents matériaux dans un même échantillon. On pourra y parvenir dans certains cas en combinant différentes techniques pour déterminer simultanément la taille et l'identité chimique des particules, par exemple en associant la microscopie électronique à l'EDX [21, 22], ou par des méthodes de CLS avancées.

f S'il faut mesurer des particules de type cœur-coquille ou multicoquilles, constituées de plusieurs substances, il convient d'examiner attentivement l'incidence des propriétés de chaque coquille ou composante eu égard à la technique de mesure de la taille, au mode de détection, aux artefacts résultants et à l'objectif de l'essai. Une interprétation erronée de la taille des particules peut survenir si l'on ne tient pas compte du fait que chaque coquille ou composante présente des propriétés spécifiques (densité, indice de réfraction, notamment) qui déterminent sa détectabilité. Les méthodes suivantes tendent à donner des résultats pouvant induire des erreurs d'interprétation pour ce type de particules : DLS, CLS et sp-ICP-MS.

g Les connaissances préalables requises sur les propriétés des particules sont notamment l'indice de réfraction complexe pour la DLS et la SAXS, la densité des particules pour la CLS et la sp-ICP-MS. On trouvera plus d'informations sur l'applicabilité des méthodes aux différents types de matériaux dans le paragraphe consacré à cet aspect pour chacune des méthodes.

Microscopie à force atomique (AFM, Atomic Force Microscopy)

Principe de mesure : AFM

40. Une pointe de dimension nanométrique fixée à l'extrémité d'un microlevier est utilisée pour balayer la surface de l'échantillon et détecter localement les différences de hauteur en mesurant la déflection du levier ou la force s'exerçant entre la pointe et l'échantillon lors du balayage de la surface. Une image est créée à partir des informations relatives à la hauteur, et le diamètre circulaire équivalent est déterminé d'après la hauteur des particules. Le mesurage des particules immobilisées sur une surface peut être

© OCDE (2023)

pratiqué sur surface sèche ou dans un liquide. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 177), la liste des normes applicables.

41. La distribution granulométrique obtenue est la distribution en nombre du diamètre basé sur la hauteur $d_{0,hgt}$.

Applicabilité

42. Cette méthode est applicable aux particules de taille comprise entre 1 nm et 1000 nm ou plus. La plage granulométrique précise dépend de l'instrument employé (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé).

43. Cette méthode ne permet de distinguer les particules individuelles des agglomérats/agrégats que dans des conditions spécifiques, si le σ_g de la distribution granulométrique est < 1.2, si les particules ont une morphologie uniforme, et si l'on dispose de connaissances préalables sur la taille des particules individuelles. Il convient d'évaluer soigneusement au cas par cas si une distinction entre les particules individuelles et les agglomérats/agrégats est possible ou non.

44. L'AFM mesure la taille indépendamment de l'identité chimique ou structurale des particules (en cas de mélange de plusieurs types de particules, par exemple).

45. Il sera donc difficile, voire impossible, de déterminer la distribution granulométrique de chaque type de particules dans un échantillon comportant un mélange de particules. C'est le cas par exemple des échantillons dans lesquels de (larges) distributions granulométriques des particules se chevauchent, ou des échantillons présentant des différences de dureté (celle-ci étant mesurée comme la résistance aux déformations plastiques localisées).

Exigences préalables

46. Éléments nécessaires pour la réalisation de l'essai

a) Appareil d'AFM équipé d'une pointe idoine ayant un apex de rayon < 10 nm.
b) La réponse en hauteur de l'instrument doit être étalonnée (selon le manuel d'instructions, par exemple). Une vérification croisée avec un matériau de référence (certifié) approprié doit être réalisée pour démontrer le bon fonctionnement de l'instrument.
c) Unité d'acquisition des données et logiciel d'évaluation des images.
d) Échantillons préparés avec un nombre de particules suffisant (voir le paragraphe 50 (les dispersions préparées doivent être conformes aux paragraphes 33 et 34.
e) Les particules étudiées doivent être immobilisées sur une surface suffisamment plane pour que l'AFM soit applicable.

Déterminants importants

47. Si l'on applique l'AFM à des particules non sphériques, il faut tenir compte du fait que seule la hauteur de la particule est déterminée avec exactitude. La taille mesurée dépend alors principalement de l'orientation de la particule. Le diamètre obtenu pour une particule peut donc différer des dimensions géométriques externes de la particule.

© OCDE (2023)

48. Les mesures latérales ne représentent pas directement la surface de l'échantillon, mais une convolution de la géométrie de l'échantillon et de la pointe. Les données obtenues dépendent donc dans une large mesure de la qualité de la pointe. Dans le sens latéral, la géométrie de la pointe a une forte incidence sur l'exactitude de mesure, et il n'est pas recommandé de prendre en compte les mesures latérales pour la détermination de la taille des particules.

49. Lors du balayage d'un échantillon, la rugosité des particules et du substrat sous-jacent sont mesurées collectivement. La rugosité de surface du substrat influe donc directement sur la taille de particule mesurée. Les échantillons doivent être préparés sur une surface plane présentant des variations de surface très faibles par rapport à la taille des particules (un pourcentage inférieur à 5 % est recommandé, [42]), par exemple sur une plaquette de silicium polie ou un support en mica.

50. Le nombre de particules à compter pour l'évaluation d'un échantillon statistiquement représentatif dépend de la largeur de la distribution granulométrique. Pour les particules dont la distribution granulométrique est étroite ($\sigma_g \leq 1.5$), 300 particules suffisent ; pour les particules dont la distribution granulométrique est large ($\sigma_g > 1.5$), il convient de mesurer 700 particules au moins. D'une manière générale, le nombre minimal de particules à analyser dépend principalement du niveau d'exactitude dans un intervalle de confiance donné (voir aussi le paragraphe 119.

51. Pour le mesurage, le mode à contact intermittent (aussi appelé *tapping*, ou mode à modulation d'amplitude) doit être préféré, afin d'endommager le moins possible l'échantillon. Ce mode, qui s'accompagne d'un faible transfert d'énergie aux particules, peut permettre de mesurer aussi les particules qui n'adhèrent pas fortement à la surface. Si un autre mode que celui du contact intermittent est utilisé, ce choix devra être justifié dans le rapport.

52. Des vibrations ou un bruit acoustique ou électronique peuvent influer sur l'acquisition d'images ; il convient de prendre des mesures d'isolation appropriées pour réduire le bruit total.

53. La taille du balayage doit être choisie en fonction de la taille des particules du matériau à analyser. Le ***Tableau 3*** indique les paramètres de balayage recommandés selon la taille des particules [42]. La vitesse/taille du balayage peut être ajustée selon les matériaux, notamment afin de limiter le niveau de bruit. Les paramètres de balayage indiqués ci-après peuvent être utilisés comme points de départ.

Tableau 3 : Paramètres de balayage recommandés selon la taille des particules

Taille des particules (nm)	Taille du balayage (µm)	Vitesse de balayage (Hz)	Taille de pixel (nm)
10	0.5x0.5	1	1
30	1x1	1	2
60	2x2	1	4

54. Il est possible de sélectionner une taille de pixel supérieure mais, dans ce cas, il est impératif de réaliser une mesure rapprochée pour s'assurer qu'aucune influence sur la hauteur n'est observée lors du mesurage.

Mesurage et évaluation des données

55. Aperçu des étapes du mesurage :

a) Régler les paramètres du microlevier en fonction de l'échantillon à mesurer (conformément aux spécifications techniques de l'instrument).

© OCDE (2023)

b) Procéder à une acquisition d'images pour une grande taille de balayage, afin d'obtenir un aperçu de la qualité de l'échantillon, de déterminer la taille de balayage requise et d'identifier un domaine dans lequel la distribution des particules est homogène.

c) Balayer l'échantillon en mode à contact intermittent, en veillant à prendre une quantité d'images adéquate (voir le paragraphe 50 dans la taille de balayage appropriée (voir le paragraphe 53.

d) Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel équivalent, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique basée sur la hauteur maximale des particules. La hauteur maximale des particules peut être obtenue par analyse manuelle ou automatisée. Si l'on choisit l'analyse automatisée, il importe de veiller à ce qu'aucun agglomérat ou artefact (doublons dus à une contamination du dessus de l'échantillon, oscillations dues à des vibrations, par exemple) ne soit mesuré.

56. La plupart des images obtenues présentent une inclinaison et/ou une courbure liée à la configuration de la plateforme ou au dispositif de balayage. La soustraction des concentrations de fond doit être mise en œuvre pour corriger le niveau. Ce nivellement peut être effectué de différentes manières, les plus courantes étant le nivellement par plan et le nivellement ligne par ligne. Le nivellement par plan corrige l'ensemble du plan en une seule étape jusqu'au zéro, en partant du principe que la surface est plane et sans courbure. Le nivellement ligne par ligne corrige le niveau de fond de chaque ligne de l'image. La prudence est recommandée si l'aplanissement est effectué ligne par ligne, car il peut altérer l'image. Dans la mesure où les échantillons doivent être préparés sur une surface plane, le nivellement par plan est normalement suffisant.

Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS, Centrifugal Liquid Sedimentation)/ Ultracentrifugation analytique (AUC, Analytical Ultracentrifugation)

Principe de mesure : CLS/AUC

57. La technique de sédimentation par centrifugation en phase liquide utilise la vitesse de sédimentation dans un champ centrifuge pour déterminer la taille des particules d'après leur masse volumique effective. La séparation/le fractionnement des particules repose sur le fait que leurs vitesses de sédimentation dépendent de leur taille. Le nombre de particules des différentes fractions est quantifié par mesure intégrale ou différentielle de l'extinction de la lumière par l'échantillon, obtenue soit par mesure de la différence entre les indices de réfraction de l'échantillon et d'un matériau de référence, soit par mesure de l'absorption des rayons X. Il existe différentes techniques de sédimentation par centrifugation en phase liquide, telles que la CLS à cuvette, la CLS à disque, ou l'ultracentrifugation analytique (AUC). Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 178), la liste des normes applicables.

58. La distribution granulométrique des particules obtenue est basée sur le diamètre de Stokes établi d'après la différence de vitesse de sédimentation. Le mesurande correspondant est soit le diamètre de Stokes basé sur l'extinction de la lumière, $d_{i,St}$, soit le diamètre de Stokes basé sur la masse, $d_{3,St}$, selon le type de détecteur employé par les instruments de centrifugation.

© OCDE (2023)

Applicabilité

59. Cette méthode est applicable aux particules de taille comprise entre 10 nm et 1000 nm ou plus. La plage granulométrique précise, particulièrement à la limite de taille inférieure, dépend des propriétés du matériau à analyser (densité, propriétés optiques, notamment), des instruments et des réglages appliqués (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé).

60. Cette méthode ne permet de distinguer les particules individuelles des agglomérats/agrégats que dans des conditions spécifiques, si le σ_g de la distribution granulométrique est < 1.2, si les particules ont une morphologie uniforme, et si l'on dispose de connaissances préalables sur la taille des particules individuelles. Il convient d'évaluer soigneusement au cas par cas si une distinction entre les particules individuelles et les agglomérats/agrégats est possible ou non.

61. La taille mesurée est basée sur la vitesse de sédimentation. Celle-ci dépend des caractéristiques chimiques, de la masse volumique effective et de la structure des particules. De ce fait, les résultats de mesure relatifs à des mélanges de particules (de composition chimique, morphologie et/ou structure différentes) ou à des échantillons inconnus doivent être manipulés avec précaution.

Exigences préalables

62. Éléments nécessaires pour le mesurage

a) Dispersions du matériau préparées conformément aux paragraphes 33 et 34.
b) Solutions de différentes densités pour le gradient de densité (conformément au paragraphe 63 et étalon de calibrage de la taille des particules (pour la CLS à démarrage en ligne ; la taille des particules et leur masse volumique effective doivent être connues avec exactitude).
c) Données suivantes :

   i. indice de réfraction des particules à la longueur d'onde de la source de lumière (si nécessaire avec le principe de détection appliqué)
   ii. coefficient d'absorption de la lumière par les particules à la longueur d'onde de la source de lumière (si nécessaire avec le principe de détection appliqué)
   iii. masse volumique effective des particules. On évitera d'utiliser la masse volumique tassée ou la masse volumique du squelette, couramment indiquées dans la littérature. La masse volumique effective peut être déterminée par les méthodes décrites dans les normes ISO 18747-1 et ISO 18747-2 [43, 44]
   iv. viscosité
   v. température du milieu de dispersion.

d) Milieux de dispersion : exempts de contamination, eau fraîchement déminéralisée et filtrée.

Déterminants importants

63. Dans la CLS à disque à démarrage en ligne, le gradient de densité est constitué de solutions préparées à différentes densités pour la mesure des particules.

© OCDE (2023)

a) Le gradient de densité doit être préparé avant le mesurage (solution aqueuse de sucrose à différentes concentrations, par exemple). Les caractéristiques du gradient pour un système de particules donné dépendent de la densité, de la taille et de la largeur de la distribution granulométrique des particules.
b) L'injection de l'échantillon au-dessus du gradient est une étape délicate de la procédure. Les systèmes de particules qui doivent être stabilisés par un agent dispersant peuvent présenter une agglomération instantanée pendant l'injection, ce qu'il convient de vérifier avant le mesurage. Pour les échantillons qui s'agglomèrent pendant le processus d'injection, le gradient de densité doit contenir l'agent dispersant dissous à la même concentration que dans la dispersion du matériau d'essai.

64. La nécessité d'un calibrage dépend du type d'instrument :

a) La CLS/AUC à cuvette ne requiert pas de calibrage de l'échelle de temps de la sédimentation, mais il convient de procéder à des vérifications régulières par des mesures de référence sur une particule étalon certifiée. Pour la CLS à cuvette, deux cuvettes contenant un matériau de référence (certifié) peuvent être analysées en même temps que les cuvettes d'échantillons.
b) CLS à disque : un étalon de taille est utilisé avant chaque mesurage sur un échantillon, aux fins de comparaison et de calibrage ; il convient de vérifier la qualité du gradient de densité et le bon fonctionnement de l'instrument avec un matériau de référence au moins une fois avant de procéder aux mesures sur le matériau à analyser. L'instrument de CLS à disque peut être utilisé sans calibrage. Dans ce cas, il importe de déterminer avec soin et exactitude chacun des paramètres d'entrée de l'équation de Stokes [45].

65. Les composants optiques de l'instrument doivent être propres et exempts de poussière avant l'utilisation. Les milieux de suspension utilisés doivent être exempts de toute contamination. Le rotor et/ou le disque de la centrifugeuse doit toujours être équilibré.

66. Les matériaux d'essai doivent être dispersibles dans un milieu de suspension adapté à la CLS. La différence entre les indices de réfraction du milieu de suspension et des particules doit être suffisante. L'absorption partielle, par le matériau de l'échantillon, de la lumière laser utilisée pour le mesurage peut influer sur le résultat, car l'intensité du signal s'en trouve réduite. Dans le cas où l'absorption des rayons X est utilisée pour la détection, le contraste d'absorption entre le milieu de suspension et les particules doit être suffisamment élevé (on suivra les instructions du fabricant).

67. Pour l'AUC, il importe de s'assurer que la centrifugeuse peut atteindre une vitesse de rotation suffisante eu égard aux particules étudiées. Dans tous les cas de figure, l'intensité de diffusion constitue un point crucial. Il est recommandé d'évaluer la configuration requise pour le nanomatériau potentiel considéré avec un matériau de référence de densité comparable.

68. Le nombre de révolutions par minute (rpm) adapté pour le mesurage dépend de la taille et de la densité du matériau à analyser, du milieu de dispersion utilisé et de l'instrument dont on dispose, et doit être choisi conformément au manuel du fabricant. Le rpm choisi doit se situer dans une plage permettant d'observer un nombre de points de mesurage suffisant pour tracer avec exactitude le profil de

© OCDE (2023)

sédimentation des particules. Pour les matériaux d'essai particulaires présentant une large distribution granulométrique, on recourra si possible à une augmentation progressive de la vitesse pendant le mesurage. L'option d'augmentation progressive selon la taille des particules permet de choisir un rpm adapté pour optimiser la séparation des différentes classes de particules.

69. La diffusion de fond de l'instrument doit être conforme aux spécifications du fabricant pour éviter les artefacts de mesure.

70. La plage de concentration réelle de l'échantillon dépend du matériau analysé et de l'instrument dont on dispose. Il convient d'étudier les particules à différents degrés de dilution de l'échantillon pour exclure toute influence de la concentration. La mesure doit porter sur un minimum de deux concentrations entre lesquelles le facteur multiplicatif doit être égal à 2.

Mesurage et évaluation des données

71. Aperçu des étapes de mesurage avec un instrument de centrifugation à disque à démarrage en ligne :

a) Initialiser l'instrument et procéder à un test de fonctionnement selon les instructions du fabricant.
b) Préparer et stabiliser (pendant 30 min environ) le gradient de densité. Ce gradient doit être adapté au matériau à mesurer (voir le paragraphe 63 et à la vitesse de rotation choisie (voir le paragraphe 68.
c) Mesurer un système de particules de référence afin de s'assurer que le gradient est préparé correctement.
d) Mesurer l'échantillon :

    i. Vérifier l'absence de dépendance vis-à-vis de la concentration en effectuant les mesures sur au moins 2 concentrations entre lesquelles le facteur multiplicatif doit être égal à 2.
    ii. Mesurer au moins 3 réplicats pour chacune des deux concentrations.
    iii. Si une influence systématique de la concentration est observée, procéder à d'autres mesures à des concentrations plus basses jusqu'à l'obtention de résultats indépendants de la concentration.

e) Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel équivalent, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

72. Aperçu des étapes de mesurage avec une centrifugeuse à cuvette/un instrument d'ultracentrifugation analytique/une centrifugeuse à disque à démarrage homogène :

a) Initialiser l'instrument et procéder à un test de fonctionnement selon les instructions du fabricant. Choisir la vitesse et la longueur d'onde à appliquer. Vérifier que le rotor de la centrifugeuse est équilibré.
b) Mesurer un blanc : il est recommandé de réaliser une mesure à blanc sur le milieu de dispersion (s'il y a lieu) avant ou pendant l'essai.
c) Mesurer l'échantillon :

© OCDE (2023)

i. Vérifier l'absence de dépendance vis-à-vis de la concentration en effectuant les mesures sur au moins 2 concentrations entre lesquelles le facteur multiplicatif doit être égal à 2.
ii. Mesurer au moins 3 réplicats pour chacune des deux concentrations.
iii. Si une influence systématique de la concentration est observée, procéder à d'autres mesures à des concentrations plus basses jusqu'à l'obtention de résultats indépendants de la concentration.
iv. La transmission, si on a prévu de la mesurer, doit se situer entre 30 et 70 % au début du mesurage.

d) Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel équivalent, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

Système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS, *Differential Mobility Analysis System*)

Principe de mesure : DMAS

73. Le système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS) est composé d'un classificateur différentiel de mobilité électrique (DEMC, *differential electrical mobility classifier*) et d'un compteur de particules à condensation (CPC) ou d'un électromètre. Pour obtenir une distribution des charges définie, il est nécessaire de faire transiter l'aérosol par un conditionneur de charge de particules avant la classification des particules par le DEMC. La classification est possible parce que les particules chargées, quand elles sont placées dans un champ électrique, dévient de leur trajectoire en fonction de leur mobilité électrique. À une tension déterminée, seules les particules ayant la mobilité électrique correspondante atteignent l'orifice de sortie du DEMC pour pénétrer ensuite dans le compteur de particules, c'est-à-dire le CPC ou l'électromètre. En modifiant la tension appliquée, on obtient le transport d'une autre fraction des particules (particules d'une autre mobilité électrique, donc d'une autre taille). Pour établir le spectre granulométrique complet, il convient donc de balayer toutes les valeurs d'une plage de tension prédéfinie. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 179), la liste des normes applicables.

74. Dans certains cas, on peut recourir à une autre configuration avec détection simultanée, en parallèle, des particules par une série d'électromètres. Cette configuration n'a pas été utilisée dans le cadre la comparaison interlaboratoire, mais pourrait produire de meilleurs résultats quand le facteur temps est déterminant. L'utilisation d'un système de détection en parallèle doit s'accompagner d'un système comportant un DEMC et un CPC.

75. La distribution granulométrique mesurée est la distribution en nombre des tailles des particules d'aérosol, obtenue sur la base de leur mobilité électrique, $d_{0,emob}$.

Applicabilité

76. Cette méthode peut être appliquée aux particules d'une taille comprise entre 2 nm et 1000 nm. La plage granulométrique précise dépend de l'instrument et des réglages appliqués (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé) ainsi que des propriétés des particules (par exemple, la densité). La méthode permet de mesurer directement la distribution granulométrique d'un aérosol et

© OCDE (2023)

d'obtenir des résultats presque instantanés. Elle ne nécessite pas de prélever un échantillon sur un substrat approprié avant l'analyse (par exemple, par microscopie électronique).

77. Cette méthode ne permet de distinguer les particules individuelles des agglomérats/agrégats que dans des conditions spécifiques, si le σ_g de la distribution granulométrique est < 1.2, si les particules ont une morphologie uniforme, et si l'on dispose de connaissances préalables sur la taille des particules individuelles. Il convient d'évaluer soigneusement au cas par cas si une distinction entre les particules individuelles et les agglomérats/agrégats est possible ou non.

78. La mesure de la taille est indépendante de la composition chimique des particules et de leur identité structurale ; par conséquent, la distribution granulométrique de mélanges de deux ou plusieurs types de particules peut également être déterminée.

Exigences préalables

79. Éléments nécessaires pour le mesurage

a) Un système d'analyse différentielle de mobilité électrique composé d'un conditionneur de charge de particules, d'un classificateur différentiel de mobilité électrique et d'un détecteur de particules, avec une efficacité appropriée de mesurage temporel et granulométrique.
b) Un échantillon aérosolisé. Si les particules ne sont pas déjà en suspension dans l'air, il est nécessaire de produire un aérosol (conformément au paragraphe 84 et, pour cela, une dispersion des particules dans un liquide (dispersion conformément aux paragraphes 33 et 34.
c) La masse volumique effective du matériau à analyser.

Déterminants importants

80. Pour les besoins du mesurage, les particules doivent être en suspension dans l'air ou transférées en phase gazeuse au moyen d'un générateur d'aérosols avant d'être envoyées vers le DMAS. À des fins spécifiques, il peut être nécessaire d'avoir préalablement déterminé la présence d'agglomérats ou d'agrégats dans l'aérosol. Cela peut s'effectuer par microscopie électronique (ME), auquel cas les échantillons destinés à la ME doivent idéalement être préparés au moyen d'une technique électrostatique ou d'impaction.

81. La plage de concentrations applicable pour l'aérosol à l'entrée du CPC est généralement comprise entre 10^3 particules/cm^3 et 10^6 particules/cm^3 pour les systèmes à balayage temporel et entre 10^4 particules/cm^3 et 10^6 particules/cm^3 pour les systèmes à détecteurs multiples. La limite réelle dépend de l'instrument et des réglages appliqués (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé).

82. L'humidité peut influer sur la mesure de l'aérosol. Si l'aérosol est produit à partir d'une suspension et qu'il présente une humidité élevée, l'utilisation d'un dispositif de contrôle de l'humidité (un sécheur à diffusion, par exemple) est recommandée pour éviter de mesurer des gouttelettes au lieu des particules. Si possible, l'humidité doit être consignée.

83. Il est nécessaire de s'assurer que le point de coupure (*cut-off*) du système d'entrée (comprenant le point de prélèvement, la tuyauterie et l'impacteur d'entrée) n'interfère pas avec la répartition granulométrique. Si la détermination de la distribution granulométrique complète requiert différentes

© OCDE (2023)

configurations de mesure, il est possible de combiner les résultats obtenus dans ces différentes configurations pour obtenir cette distribution complète.

84. Si le matériau d'essai n'est pas présent sous forme d'aérosol, un générateur d'aérosols doit être utilisé pour aérosoliser les particules avant le mesurage. Il convient alors de recourir à un générateur d'aérosols par électrospray, un atomiseur ou un générateur acoustique d'aérosol à sec. Les autres générateurs ne sont pas recommandés parce qu'ils produisent un aérosol instable ou une forte quantité d'agglomérats [46]. La distribution granulométrique des particules dans l'aérosol produit dépend du générateur d'aérosols employé (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé). Lorsqu'on utilise un atomiseur, il est impératif de préconditionner les particules dans un sécheur pour réduire l'humidité du flux d'échantillon et éviter de mesurer des gouttelettes plutôt que des particules. Il est important d'utiliser uniquement de l'eau ultrapure (une eau distillée deux fois est recommandée) pour les générateurs d'aérosols. Une eau non traitée contient des sels et résidus biologiques qui influent grandement sur les résultats en formant une couche de contamination sur les particules et en générant des particules artificielles à partir des gouttelettes.

85. Le système doit être calibré selon les directives du manuel d'utilisation de l'instrument. Ce manuel doit être conforme aux normes ISO pertinentes, à savoir ISO 15900 et ISO 28439 [47, 48] ; dans le cas du CPC, le manuel d'utilisation doit être conforme à la norme ISO 27891 [49].

86. Choix de la tuyauterie : En raison de la charge électrique de surface, les particules ont tendance à se déposer sur les parois. La tuyauterie complète et tous les raccordements au sein du dispositif expérimental doivent être constitués d'un matériau conducteur (acier inoxydable ou caoutchouc conducteur, par exemple) et doivent être aussi courts que possible afin de prévenir les pertes de particules.

87. La séparation des particules en fonction de leur mobilité électrique est entravée par le mouvement brownien. Comme ce phénomène est d'autant plus marqué que les particules sont de petite taille, l'utilisation d'un débit élevé (≥ 10 L/min) dans le DEMC est recommandée pour prévenir la perte des plus petites particules.

88. Pour les systèmes avec CPC, le DMAS doit être utilisé en mode comptage seul. Si la concentration de particules est suffisamment élevée pour dépasser le mode photométrique, le CPC doit être calibré en fonction de l'intensité de diffusion spécifique du matériau. On trouvera des indications supplémentaires sur le calibrage dans la norme ISO 27891 correspondante [49].

Mise en œuvre du mesurage et évaluation des données

89. Aperçu des opérations requises pour le mesurage :

(a) Initialiser l'instrument et équilibrer la température.
(b) Vérifier le système pour déterminer s'il est opérationnel et exempt de particules (contrôle du zéro).
(c) Mesurer les concentrations de fond et/ou le milieu de dispersion exempt de particules aérosolisées (si l'aérosol est produit à partir d'une dispersion).
(d) Pour chaque échantillon, effectuer les opérations suivantes :
(e) Mesurer le nombre de particules par volume.
(f) Effectuer au moins cinq balayages, avec un temps global de mesurage d'au moins 15 min.

© OCDE (2023)

(g) Vérifier la dépendance à la concentration avec au moins deux réplicats d'échantillon à des concentrations différentes.
(h) Si une influence systématique de la concentration est observée, procéder à d'autres mesures à des concentrations plus basses jusqu'à l'obtention de résultats indépendants de la concentration.
(i) Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel équivalent, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

90. Parce que l'effet du mouvement brownien augmente quand la taille des particules diminue (en particulier, quand elles sont < 100 nm), il se produit des pertes par diffusion du fait du dépôt de nanomatériaux sur les parois du récipient. Il faut corriger ces pertes soit via le logiciel d'instrument même, soit par calcul manuel [50]. Des pertes par diffusion particulièrement élevées requièrent une conception spécifique des dispositifs d'échantillonnage et de mesure pour la plage granulométrique inférieure à 10 nm [29].

91. Avec l'augmentation de la taille des particules, la probabilité de charges de surface multiples s'accroît. Cela influe sur le résultat du mesurage et doit être corrigé, par le logiciel d'instrument ou manuellement, selon les consignes du manuel d'utilisation de l'instrument.

92. L'analyse agrégée offerte par certains logiciels d'instrument doit être évitée, car les algorithmes appliqués diffèrent d'un fabricant d'instruments à l'autre et ne sont pas standardisés.

93. Une contamination de fond manifeste provenant du milieu de dispersion doit être mathématiquement soustraite (par ajustement des concentrations de fond, par exemple) de la distribution granulométrique des particules avant l'analyse granulométrique. Les concentrations de fond peuvent être déterminées par la mesure de la solution sans les particules dispersées.

94. Si l'on doit mesurer la distribution granulométrique de particules individuelles mais que des agglomérats sont visibles (plusieurs maximums correspondants) ou soupçonnés dans la distribution granulométrique, le mesurage doit être répété avec un coefficient de dilution supérieur. Il est recommandé de compléter ce mesurage par une méthode complémentaire (voir le paragraphe 35).

95. L'efficacité du dénombrement dépend du CPC utilisé et des réglages de l'instrument. L'efficacité du dénombrement du CPC tend à diminuer avec la taille des particules. Cela pourrait conduire à une sous-estimation des petites particules d'un diamètre d < 30 nm. En général, l'efficacité du dénombrement est automatiquement corrigée à l'aide d'une courbe de référence fournie par le fabricant de l'instrument. À défaut de correction automatique, il faut procéder à une correction manuelle. De plus, il est possible que l'efficacité du dénombrement dépende de la nature du matériau : par exemple, un CPC à base d'eau ne permet pas de dénombrer correctement des nanomatériaux hydrophobes.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*)

Principe de mesure : DLS

96. Pour analyser les mouvements de particules, on illumine une dispersion diluée de particules avec une source laser et on mesure les fluctuations d'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps. En supposant que les particules sont en mouvement brownien, il est possible de déterminer le coefficient de

© OCDE (2023)

diffusion translationnelle, puis de calculer le diamètre sphérique équivalent hydrodynamique à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein [51]. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 180), la liste des normes applicables.

97. La distribution granulométrique qui en résulte est basée sur la diffusion de la lumière résolue en temps et pondérée en intensité. Le mesurande obtenu est le diamètre sphérique équivalent hydrodynamique pondéré en intensité $d_{i,hyd}$.

Applicabilité

98. Cette méthode peut être appliquée à des particules d'une taille comprise entre 1 nm et 1000 nm et même, dans certaines conditions, à de plus grosses particules. La plage granulométrique précise, en particulier la limite de taille inférieure, dépend de l'instrument utilisé, des réglages appliqués (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé), de la qualité de l'échantillon (par exemple, la distribution de la taille : le signal de mesure des grosses particules se superpose à celui des petites, ce qui cause une sous-estimation du nombre de petites particules) ainsi que des propriétés des particules à analyser (contraste optique par rapport au milieu).

99. Les matériaux d'essai doivent être dispersibles dans un milieu pour que la méthode DLS puisse être appliquée. La suspension doit être exempte de particules de poussière ou de tout autre contaminant optique et être translucide, sans forte turbidité visible (conformément aux paragraphes 33 et 34. L'absorption par l'échantillon de la lumière laser utilisée peut réduire la force du signal. La différence entre les indices de réfraction (conformément aux instructions du manuel de l'instrument) du milieu de suspension et de l'échantillon doit être suffisante.

100. Cette méthode ne permet pas de faire la distinction entre les particules individuelles, les agglomérats et/ou les agrégats. La taille mesurée est basée sur les propriétés de diffusion, lesquelles dépendent de la structure physique et de la composition chimique des particules. Si l'échantillon contient un mélange de populations de particules ayant des propriétés de diffusion extrêmement différentes, la distribution granulométrique des particules qui diffusent plus faiblement la lumière ne pourra pas, la plupart du temps, être déterminée correctement. Dans certains cas, il peut être possible d'identifier une plus petite fraction de particules selon des méthodes mathématiques, mais cette façon de procéder n'est pas conseillée pour les distributions polydispersées, car elle présente un degré élevé d'incertitude. L'incertitude qui en résulte dépend des différences de taille et de propriétés de diffusion des composants du mélange.

Exigences préalables

101. Éléments nécessaires pour le mesurage

a) Un instrument DLS (homodyne, hétérodyne ou en intercorrélation [deux homodynes simultanés]), un réservoir d'échantillon et une unité de calcul.
b) L'échantillon préparé en suspension (conformément aux paragraphes 33 et 34 ; toutes les étapes de la préparation de l'échantillon doivent être consignées. S'assurer que la suspension est exempte de bulles d'air lors de son insertion dans la cuvette de mesure.
c) L'indice de réfraction des particules (requis uniquement pour la transformation de la distribution granulométrique, voir le paragraphe 108, ainsi que l'indice de réfraction, la température et la viscosité du milieu de suspension à la température utilisée.

© OCDE (2023)

d) Un milieu de dispersion exempt de contamination, eau fraîchement déminéralisée et filtrée (dimension des pores : 0.2 µm [51]).

Déterminants importants

102. Le bon fonctionnement du système optique de l'instrument doit être périodiquement vérifié à l'aide d'un solvant haute pureté (toluène, par exemple). L'intensité de la lumière diffusée doit être conforme aux spécifications du fabricant de l'instrument. De plus, il convient de contrôler la performance de l'instrument et les réglages en mesurant un matériau de référence nanoparticulaire certifié pour l'analyse de la taille des particules selon la méthode DLS, idéalement dans la même plage granulométrique que le matériau soumis à l'examen.

103. La plage de concentrations de l'échantillon dépend de l'instrument disponible ; l'intensité de la lumière diffusée par l'échantillon doit être au moins 10 fois supérieure à celle du milieu de dispersion à l'état pur. Il convient d'analyser l'intensité de la lumière diffusée à des concentrations d'échantillon différentes afin d'exclure une dépendance systématique vis-à-vis de la concentration (au moins deux concentrations, différant d'un facteur 2).

104. Une trop forte concentration de l'échantillon provoque une diffusion multiple qui accélère la fluctuation d'intensité, ce qui fait décroître plus rapidement la fonction de corrélation, réduit les diamètres apparents et augmente la polydispersité. En outre, les interactions particule-particule deviennent plus importantes et une diffusion collective domine, au lieu d'une autodiffusion. Ces effets peuvent également se produire lorsque le trajet optique à travers l'échantillon est trop long. Afin d'éviter ces effets, une concentration inutilement élevée doit être évitée, le trajet à travers l'échantillon doit être court (utilisation de petites cuvettes d'échantillon, par exemple) et la rétrodiffusion doit être utilisée si elle est disponible.

105. La méthode DLS permet de déterminer le diamètre sphérique équivalent hydrodynamique d_{hydr}. Ce diamètre inclut la double couche électrique autour de la surface de la particule en solution ainsi que toute espèce moléculaire rattachée à la particule (agents dispersants, protéines, par exemple). L'épaisseur de la double couche peut changer en fonction de l'agent dispersant ou des conditions de dispersion (pH, force ionique, par exemple) ; il est donc important de toujours consigner toutes les étapes de la préparation de l'échantillon pour permettre les comparaisons de différentes mesures.

106. La lumière diffusée par les grosses particules domine le spectre mesuré, ce qui peut entraîner le masquage ou la sous-estimation de la présence de plus petites particules étant donné que l'intensité de diffusion de la lumière est proportionnelle à la puissance sixième du rayon des particules en dehors de la région de diffusion de Mie. Le signal de mesure des grosses particules se superpose à celui des petites, ce qui cause une sous-estimation du nombre de petites particules. Il est possible de réduire la complexité des échantillons de distribution granulométrique large ou multimodale en séparant les plus grosses particules avant la détermination des petites particules – par exemple, par fractionnement par couplage flux-force ((FFF, *Field Flow Fractionation*) avant le mesurage, et mesurages successifs des fractions. Cependant, ces procédures ne font pas partie de la présente ligne directrice.

107. Le diamètre hydrodynamique du nanomatériau potentiel soumis à l'essai dépend de l'épaisseur de la double couche, qui peut changer en fonction des conditions de dispersion (milieu de dispersion, valeur du pH, agents dispersants, concentration et force ionique, par exemple). Les diamètres hydrodynamiques de matériaux différents ne sont donc comparables que lorsque les mêmes conditions de dispersion sont appliquées.

© OCDE (2023)

108. La transformation mathématique du mesurande obtenu en distribution en nombre ou en volume n'est pas recommandée parce qu'elle multiplie grandement les incertitudes qui entachent l'analyse. Si la distribution granulométrique obtenue est néanmoins transformée, toutes les étapes du processus de transformation doivent être consignées pour permettre l'évaluation de la qualité.

Mesurage et évaluation des données

109. Aperçu des opérations requises pour le mesurage :

a) Réchauffer l'instrument pour permettre au laser de se stabiliser dans un intervalle de temps conforme aux instructions du fabricant (habituellement, de 15 à 30 min).
b) Mesurer le milieu de dispersion en l'absence des particules (stabilisation thermique à température ambiante dans la plage $\Delta T = \pm 0.1$ °C) afin de vérifier que le fond (s'il est présent) est exempt de particules (faible taux de comptage, par exemple).
c) Mesurer au moins deux concentrations différentes avec au moins trois réplicats de l'échantillon dispersé (stabilisation thermique à température ambiante dans la plage $\Delta T = \pm 0.1$ °C). Consigner le diamètre moyen des particules, à l'aide d'une analyse de corrélation ou de fréquence.
d) Si une influence systématique de la concentration est observée, procéder à d'autres mesures à des concentrations plus basses jusqu'à l'obtention de résultats indépendants de la concentration.
e) Dans une première étape après la mesure, vérifier visuellement l'échantillon pour déceler la sédimentation de particules ; si des particules se sont sédimentées, la dispersion n'était pas stable et la mesure doit être reprise avec une dispersion stable. De plus, s'assurer que les critères de qualité de l'instrument sont atteints conformément au manuel. Le manuel doit être conforme aux normes ISO pertinentes (c.-à-d. ISO 22412).
f) Évaluer les données au moyen du logiciel disponible. Les instruments usuels proposent divers algorithmes pour l'évaluation des résultats (pour de plus amples informations, on consultera les normes ISO 22412 [51] et ISO/TR 22814 [52]). Il est essentiel de consigner l'algorithme appliqué et les réglages internes (voir le paragraphe 176. La distribution granulométrique doit être présentée en vue cumulée.
g) Pour l'analyse de corrélation, la méthode des cumulants n'est valide que pour les échantillons dont l'indice de polydispersité (IPD) est inférieur à 0.15 pour la détermination des valeurs granulométriques moyennes. Dans le cas des échantillons présentant une plus large distribution granulométrique, il convient d'utiliser des algorithmes de calcul de la distribution (CONTIN, MCNN, Histogram, par exemple [51]).

© OCDE (2023)

Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*)

Principes de mesure

110. La microscopie électronique à balayage (MEB) est une méthode principalement utilisée pour analyser la morphologie du matériau soumis à l'essai. L'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons focalisé, et les électrons secondaires ou rétrodiffusés sont détectés. Cela produit l'image d'une projection bidimensionnelle de l'échantillon. Les électrons secondaires sont sensibles à la morphologie de la surface ; les électrons rétrodiffusés sont plus sensibles aux différences dans la composition du matériau.

111. Le microscope à balayage électronique (MEB également) peut parfois être utilisé en mode transmission (microscope électronique à balayage et à transmission, ou MEBT), ce qui fournit un meilleur contraste pour les structures du matériau dans la plage nanométrique. De plus, certains MEB peuvent être utilisés en mode environnemental, un mode de fonctionnement permettant l'analyse d'échantillons instables sous vide ou non conducteurs ; cependant, avec un MEB environnemental, la technique perd en sensibilité.

112. La microscopie électronique à transmission (MET) consiste à détecter les électrons qui traversent un échantillon. Cela produit l'image d'une projection bidimensionnelle des particules. La résolution latérale réalisable avec la MET est habituellement supérieure à celle de la MEB. Pour plus d'informations sur les méthodes MEB et MET, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 181), la liste des normes applicables.

113. Avec les techniques basées sur la ME, la distribution granulométrique en nombre du diamètre circulaire équivalent $d_{0,ecd}$ est déterminée à partir de micrographies. De surcroît, il est possible de déterminer les diamètres minimal et maximal de Féret.

Applicabilité

114. Cette méthode peut être appliquée à des particules d'une taille se situant entre1 nm et 1000 nm. La plage granulométrique réellement accessible dépend des réglages de l'instrument, des spécifications techniques de l'équipement utilisé et, également, des propriétés du matériau d'essai (contraste des particules, charge de surface, par exemple). Pour déterminer si le matériau à examiner peut être mesuré par ME, il faut prendre en compte les éléments suivants :

a) Les particules doivent être stables dans les conditions de mesure (sous vide, sous faisceau d'électrons).

b) Le contraste doit être suffisamment grand pour que les particules puissent être exactement délimitées par rapport à l'arrière-plan.

115. Cette méthode permet de distinguer les particules individuelles des agrégats/agglomérats. De plus, il est possible d'identifier les mélanges de particules constituées de substances différentes en couplant l'instrument avec une technique de détermination de l'identité chimique (sonde EDX, par exemple). Pour ce qui est des particules individuelles présentes en tant qu'éléments constituants d'agglomérats/agrégats, on ne peut en principe identifier et déterminer leur taille que si leurs frontières physiques sont entièrement visibles.

© OCDE (2023)

Exigences préalables

116. Éléments nécessaires pour le mesurage

a Un MEB ou MET ayant la résolution minimale requise, en taille de pixels, pour le diamètre prévu des particules (voir le paragraphe 124.

b. n échantillon préparé : la préparation peut être effectuée selon l'une des trois voies décrites au paragraphe 25**.**

117. Le calibrage et l'entretien de l'instrument doivent être effectués périodiquement et conformément aux instructions du manuel d'utilisation avant le mesurage. Le manuel en question doit être conforme aux normes ISO pertinentes. On trouvera de plus amples informations in [19, 53] pour la MEB et [24, 54] pour la MET.

Déterminants importants

118. Avant l'évaluation quantitative des images obtenues, il faut examiner visuellement par ME la qualité de préparation de l'échantillon. On peut distinguer les trois classes suivantes de qualité de préparation (conformément au paragraphe 15 :

a. Qualité de préparation optimale

Les images peuvent être évaluées visuellement ; le cas échéant, une évaluation automatisée est possible :

i. Les particules individuelles sont bien séparées de telle sorte qu'elles ne se touchent pas et ne se recoupent pas.

ii. Le nombre d'impuretés et d'artéfacts sur les images est limité et leur signal se distingue de celui des particules en taille, forme, texture ou valeur de gris.

b. Qualité de préparation acceptable

Les images peuvent être évaluées visuellement :

i. Les particules ne sont pas entièrement séparées et se touchent ; cependant, la plupart des particules peuvent être distinguées comme étant séparées.

ii. Il peut y avoir quelques agglomérats/agrégats (voir le paragraphe dans lesquels il est impossible de distinguer visuellement les particules individuelles qui sont leurs éléments constituants.

iii. Le nombre d'impuretés et d'artéfacts sur les images est limité et leur signal se distingue de celui des particules en taille, forme, texture ou valeur de gris.

c. Qualité de préparation insuffisante

i. Les particules ne peuvent pas être mesurées si l'une des situations suivantes survient :

ii. Les particules individuelles sont fortement agglomérées et il est impossible de faire la distinction entre les particules individuelles, les agrégats et leurs agglomérats.

iii. Le matériau d'essai ou son revêtement sont extrêmement sensibles au faisceau d'électrons et/ou au vide, ce qui cause une dégradation des particules.

iv. Il est impossible de distinguer les artéfacts ou les impuretés des particules à analyser.

119. Un nombre suffisant de particules individuelles doit être disponible dans le spécimen. Le nombre de particules à dénombrer pour l'évaluation d'un échantillon statistiquement représentatif dépend de la

© OCDE (2023)

largeur de la distribution granulométrique. Pour les particules dont la distribution granulométrique est étroite ($\sigma_g \leq 1.5$), 300 particules suffisent, mais pour celles dont la distribution granulométrique est large ($\sigma_g > 1.5$), il convient de mesurer au moins 700 particules, qu'elles apparaissent sur une seule ou plusieurs images. D'une manière générale, le nombre minimal de particules à analyser dépend principalement du niveau d'exactitude dans un intervalle de confiance donné.

a. Si une erreur maximale (δ) est souhaitée à un niveau de confiance donné, le nombre de particules (N) à mesurer peut être estimé à l'aide de l'équation $logN = -2\,log\delta + K$, où K est une constante numériquement déterminée par le niveau de confiance, la largeur de la distribution, le type de grandeur de la distribution et l'exposant de la variable de processus (voir [20, 55, 56] pour de plus amples informations).

120. Le contraste entre les particules et le substrat doit être suffisamment grand pour permettre une acquisition, un traitement et une analyse fiables des images.

a. S'il faut mesurer des particules organiques ou polymères et qu'un faible contraste est détecté, il est recommandé de colorer au préalable le matériau d'essai afin d'accroître le contraste.
b. Les particules de matériaux non conducteurs peuvent accumuler des charges électrostatiques. Il est possible de remédier aux problèmes de contraste qui en résultent en prenant les mesures suivantes (par ordre décroissant de priorité) :
   i. Réduire l'intensité du faisceau d'électrons.
   ii. Améliorer la conductivité entre l'échantillon et le substrat, en optimisant le protocole de préparation, par exemple.
   iii. Appliquer un mince revêtement conducteur sur l'échantillon avant la mesure. Cela accroît la dimension des particules et cause donc un biais dans la détermination de la granulométrie. L'épaisseur du revêtement dépend de l'appareil de pulvérisation utilisé, du matériau pulvérisé et des réglages (on consultera le manuel relatif à l'instrument). L'épaisseur du revêtement doit être consignée et soustraite de la taille obtenue pour les particules.

121. Afin de déterminer avec exactitude la taille des particules, une certaine résolution minimale est nécessaire. Le ***Tableau 4*** récapitule les résolutions requises (en nm/pixel) en fonction des différentes plages de tailles des particules à mesurer [57].

© OCDE (2023)

Tableau 4 : Plages de tailles des particules et résolutions requises en fonction ces plages de tailles [57]

Plage de tailles de particules (nm)	Résolution (nm/pixel)	Incertitude associée au diamètre de 1 pixel dans l'image (%)
14 à 21	1.5 à 2.0	10.0 à 11.0
22 à 26	2.0 à 2.5	9.0 à 10.0
27 à 37	2.5 à 3.0	8.0 à 9.0
38 à 49	3.0 à 4.0	8.0
50 à 62	4.0 à 5.0	8.0
63 à 100	5.0 à 6.0	5.0 à 6.0
101 à 199	6.0 à 12.0	6.0
200 à 1000	12.0 à 20.0	5.0 à 6.0

122. Un soin particulier doit être apporté à la détermination de la distribution granulométrique multimodale d'un mélange de populations de particules quand la taille des particules diffère significativement d'une population à une autre, autrement dit quand il existe entre ces populations un écart d'au moins deux plages de tailles (entre la rangée 1 et la rangée 3, par exemple) selon les chiffres de la première colonne du ***Tableau 4***. Pour les distributions multimodales, il faut acquérir des images à différentes résolutions (voir le ***Tableau 4***) et évaluer les images correspondant à chaque groupe de particules respectif uniquement. La surface évaluée doit être la même sur toutes les images, quelle que soit leur résolution.

Note 1 : Il ne s'agit que d'une recommandation et cet élément ne faisait pas fait partie de la comparaison interlaboratoire.
Note 2 : Il est recommandé de coupler le mesurage à une méthode complémentaire.

Mesurage et évaluation des résultats

123. Obtenir les images conformément à la procédure suivante.

1. Régler les paramètres de l'instrument de manière à placer le faisceau d'électrons dans des conditions optimales pour une imagerie haute résolution avec le grossissement voulu. Désactiver la mise au point dynamique et la correction d'inclinaison pour prévenir les défocalisations.

3. Acquérir plusieurs images à large champ de vision, à des résolutions différentes, pour obtenir un aperçu de la qualité de l'échantillon et déterminer la taille de pixel appropriée pour l'évaluation du diamètre (voir le paragraphe 121).
4. Si la qualité de préparation de l'échantillon est acceptable, les images doivent être prises en quantité suffisante et à une résolution appropriée pour permettre d'évaluer le nombre nécessaire de particules individuelles en fonction de la largeur de la distribution granulométrique (voir les paragraphes 119, 122.
5. Si la qualité de préparation de l'échantillon est insuffisante, il faut l'optimiser et procéder à nouveau à l'analyse MEB ou MET.

124. Spécifier le comptage des particules. (Pour plus d'informations, voir [19, 24].)

a) Selon l'objectif du mesurage, la spécification du comptage de particules peut être différente pour les particules individuelles, les agglomérats et les agrégats. On

© OCDE (2023)

trouvera des exemples de modes de spécification du comptage de particules, notamment par l'ISO, dans les normes ISO 21363 [24] ou ISO 19749 [19]. Une publication de Bresch et al. (2022) [89] fournit une vue d'ensemble des quatre règles différentes de comptage et les compare entre elles. La spécification choisie pour le comptage des particules doit être consignée. À des fins réglementaires, la spécification du comptage des particules énoncée dans la législation correspondante doit être utilisée.

b) Seules les particules qui peuvent être clairement distinguées des autres et qui sont entièrement visibles sont comptées. Lorsque des particules et des éléments constituants ne peuvent pas être identifiés clairement, on ne détermine pas leur taille et on les exclut de l'analyse. Le nombre d'agglomérats et d'agrégats exclus doit être consigné.

c) La détermination de la taille des particules à partir d'images peut être entachée d'incertitudes en raison de l'évaluation subjective de l'analyste. L'utilisation de niveaux différents de grossissement de l'image pendant l'évaluation de la taille des particules joue à cet égard un rôle essentiel. La reproductibilité la plus élevée est obtenue si le diamètre des particules est évalué automatiquement à partir des traces types de valeurs de gris (voir la partie D de l'Appendice, au paragraphe 207. La fiabilité de la détection automatique, qui dépend de l'algorithme utilisé, est souvent moins bonne que celle de l'évaluation manuelle, étant donné que le seuil dépend de la tension d'accélération, du matériau et de la taille des particules [58]. De plus, une morphologie complexe de la surface a des effets sur les résultats. Lorsqu'il est possible de disposer d'un matériau nanoparticulaire de référence certifié comparable au matériau d'essai, il convient de l'utiliser pour réaliser une vérification croisée des résultats dans les mêmes conditions d'analyse. Si l'évaluation du diamètre est effectuée manuellement à l'aide d'outils de traçage et de marquage du diamètre extérieur de la particule, les images doivent être évaluées à des niveaux de grossissement élevés pour que les résultats soient reproductibles. Le grossissement de l'image est élevé lorsque les pixels individuels sont visibles dans l'image. Les particules sont délimitées pour le mesurage, puis on détermine le diamètre minimal de Féret, le diamètre maximal de Féret et le diamètre circulaire équivalent. Des vérifications croisées des résultats doivent être effectuées par plusieurs personnes.

d) Le nombre minimal de particules à compter est N=300 (distribution granulométrique étroite, $\sigma_g \leq 1.5$) ou N=700 (distribution granulométrique large, $\sigma_g > 1.5$). (Voir le paragraphe 119.

e) En principe, il est possible de mesurer des particules (éléments constituants) d'agrégats et d'agglomérats si les frontières des particules projetées peuvent être complètement identifiées. La possibilité d'identifier les frontières de particules qui se

© OCDE (2023)

touchent dans une image de ME dépend de la qualité de l'image. Cette qualité de l'image peut être influencée par les propriétés du matériau d'essai ainsi que par d'autres facteurs, notamment les réglages appliqués, la perception subjective de l'analyste et la qualité de préparation de l'échantillon. En général, la performance de la microscopie électronique varie d'un instrument à l'autre. L'incertitude associée à la distribution granulométrique peut être plus élevée pour les éléments constituants d'un agglomérat ou d'un agrégat que pour les particules individuelles, puisque les frontières physiques des éléments constituants peuvent ne pas être aussi faciles à distinguer que celles des particules. Le comptage des éléments constituants d'un agrégat/agglomérat peut être possible à la surface de l'agrégat/agglomérat (MEB) ou dans le plan image (MET). Pour plus de précisions, voir [11, 13, 24, 59, 60].

125. Les dispositifs d'enregistrement des mesures du diamètre des particules peuvent aller de l'automatisation à l'enregistrement semi-automatique. L'utilisation d'un logiciel approprié de traitement d'images permet de consigner le diamètre semi-automatiquement dans une feuille de calcul pendant l'évaluation visuelle des images. Quand la détection est semi-automatique, les particules sont identifiées par mesure visuelle manuelle et les diamètres respectifs sont calculés par le programme et consignés dans une feuille de calcul. Toutefois, il n'existe pas encore de méthode validée pour une détection complètement automatisée des particules.

Analyse par traçage des particules (PTA, *Particle Tracking Analysis*)

Principe de mesure : PTA

126. La dispersion de particules est illuminée au moyen d'un laser et la lumière diffusée est détectée par un capteur à semi-conducteurs (CCD, CMOS, par exemple). La lumière diffusée par les particules individuelles est suivie dans des fichiers vidéo et la diffusion bidimensionnelle est mesurée et convertie en diamètre sphérique équivalent hydrodynamique à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 182), la liste des normes applicables.

127. Cette méthode permet de mesurer la distribution granulométrique en nombre des particules, basée sur le diamètre sphérique équivalent hydrodynamique, $d_{0,hyd}$.

Applicabilité

128. Cette méthode peut être appliquée aux particules d'un diamètre se situant entre 10 nm et 1000 nm environ, et même à de plus grosses particules. La plage de travail réelle en termes de taille des particules et, en particulier, à la limite inférieure de détection de cette taille, dépend principalement des propriétés optiques du matériau analysé, du mouvement brownien et de l'instrument utilisé (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé).

129. La taille mesurée est basée sur les propriétés de diffusion, lesquelles dépendent de la structure physique et de la composition chimique des particules. Si l'échantillon contient un mélange de particules ayant des propriétés de diffusion notablement différentes, la contribution à la distribution granulométrique

© OCDE (2023)

des particules diffusant la lumière le plus faiblement pourrait ne pas être déterminée. Cette méthode n'établit pas de distinction entre les particules individuelles et les agrégats/agglomérats.

Exigences préalables

130. Éléments nécessaires pour le mesurage :

a) Un système d'analyse par traçage des particules et une unité de calcul.
b) Des échantillons préparés (conformément aux paragraphes 33 et 34 ; toutes les étapes de la préparation des échantillons doivent être consignées.
c) Suspension du matériau d'essai : viscosité connue et température stable durant l'analyse, y compris les répétitions.

Déterminants importants

131. La mesure d'un matériau à large distribution granulométrique est problématique car l'intensité de diffusion de la lumière est proportionnelle à la puissance sixième du rayon des particules. Le signal de mesure des grosses particules se superpose à celui des petites, ce qui cause une sous-estimation du nombre de petites particules.

132. Les matériaux d'essai doivent être dispersibles dans un milieu de dispersion pour que l'analyse PTA puisse être effectuée. Cette méthode peut être appliquée dans la plage de concentrations se situant entre 10^6 particules par mL et 10^9 particules par mL. Cette dispersion de particules grandement diluée est susceptible d'influer sur les résultats en raison de la dissolution partielle des particules. Il est essentiel d'avoir une connaissance préalable de la solubilité et/ou du taux de dissolution.

133. Le diamètre hydrodynamique du nanomatériau potentiel soumis à l'essai dépend de l'épaisseur de la double couche, qui peut changer en fonction des conditions de dispersion (milieu de dispersion, valeur du pH, agents dispersants, concentration, force ionique, par exemple). Les diamètres hydrodynamiques de matériaux différents ne sont donc comparables que lorsque les mêmes conditions de dispersion sont appliquées.

134. Nombre de particules détectées : pour les particules dont la distribution granulométrique est étroite ($\sigma_g \leq 1.5$), 300 particules suffisent, mais pour celles dont la distribution granulométrique est large ($\sigma_g > 1.5$), il convient de mesurer au moins 700 particules (voir le paragraphe 122.

135. En général, il n'est pas nécessaire que l'instrument soit calibré par l'opérateur, car le calibrage de la taille de l'image a été effectuée par le fabricant de l'instrument. Néanmoins, il convient d'effectuer périodiquement une mesure de qualification des performances à l'aide d'un nanomatériau de référence certifié pour la taille des particules, dans la même plage granulométrique que les particules de l'échantillon, pour s'assurer du bon fonctionnement de l'instrument. Si l'instrument a été modifié ou l'optique a été changée, il convient d'effectuer le calibrage de la taille de l'image conformément aux spécifications données par le fabricant de l'instrument.

136. Les composants optiques de l'instrument doivent être propres et exempts de poussière avant l'utilisation. Le milieu de dispersion doit être exempt de contamination. L'eau doit être fraîchement déminéralisée et filtrée (taille des pores : ≤ 0.2 µm) avant l'utilisation, de manière à atteindre un état de grande pureté.

© OCDE (2023)

Mesurage et évaluation des données

137. Aperçu des opérations requises pour le mesurage :

a) Réchauffer l'instrument et stabiliser l'intensité et la température du laser (habituellement, pendant 15 à 30 min) selon les directives du fabricant de l'instrument.
b) Optimiser les coordonnées xyz par ajustement de l'optique ou de la chambre à échantillon.
c) Effectuer un contrôle de fond de l'instrument ; si le milieu de dispersion exempt de particules est disponible, il convient également de le mesurer et de l'utiliser pour le contrôle de fond.
d) Mesurer l'échantillon
e) Injecter l'échantillon dans la chambre de mesure par procédé manuel ou automatisé.
f) Régler la mise au point de l'instrument – les particules ne doivent pas être floues ni présenter un nombre excessif d'anneaux de diffraction.
g) Ajuster le contraste en fonction du système.
h) Lorsque le mode débit n'est pas utilisé pendant la mesure, la dispersion doit être immobile. Une faible dérive constante peut être corrigée. Si une dérive est observée, il se peut que le système ne soit pas entièrement exempt de bulles d'air ou qu'il y ait une fuite.
i) Illuminer l'échantillon avec une longueur d'onde laser appropriée pour les nanomatériaux et pour l'obtention d'un contraste optimal.
j) Mesurer l'échantillon dispersé (thermiquement stable $\Delta T = \pm 0{,}1$ °C) – au moins cinq fois (cinq injections), avec dans chaque cas un temps d'enregistrement de 90 à 120 secondes.
k) Vérifier la dépendance à la concentration avec au moins deux réplicats d'échantillon à des concentrations différentes.
l) Si une influence systématique de la concentration est observée, procéder à d'autres mesures à des concentrations plus basses jusqu'à l'obtention de résultats indépendants de la concentration.
m) Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel équivalent, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

138. Le logiciel de traitement exclut les traces de particules qui se croisent et celles qui sont trop courtes. Certains fabricants d'instruments permettent que le seuil soit réglé manuellement, auquel cas cela doit être fait conformément à la recommandation du fabricant.

© OCDE (2023)

Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS, *Small Angle X-Ray Scattering*)

Principe de mesure : SAXS

139. La diffusion élastique des rayons X par des particules contrastantes produit une distribution d'intensité angulaire. La force de la distribution d'intensité est déterminée par le contraste de densité électronique entre les phases et l'angle défini par les échelles de longueur : les gros objets diffusent fortement aux petits angles et les petits objets, aux angles plus grands. La distribution d'intensité contient donc des informations sur la taille et la structure des particules. Cette diffusion peut être utilisée pour déterminer la taille et la distribution granulométrique des particules. L'angle de diffusion est habituellement donné sous la forme du vecteur de diffusion *q*. Des méthodes basées sur la linéarisation [61] telles que celles de Guinier et de Porod ont été utilisées pour déterminer certains paramètres morphologiques ; d'autres méthodes font appel à un ajustement complet des données de diffusion recueillies et corrigées. Cela permet, d'une part, une description plus exacte des matériaux réels, tenant également compte de l'interférence entre les particules et des distributions granulométriques, et, d'autre part, la pondération des points de données en fonction de leurs incertitudes. En pratique, les informations collectées sur le profil de diffusion représentent étroitement les informations sur la distribution granulométrique pondérée en surface ou en volume et fournissent une base pour une détermination exacte des distributions monomodales ou multimodales pondérées en volume. Avec une correction appropriée des données, il est possible de mesurer les intensités avec une incertitude de 1 % [62] entre les points de données et de 5 à 10 % pour le facteur d'échelle de l'intensité absolue [61]. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 183), la liste des normes applicables.

140. La distribution granulométrique mesurée représente étroitement une distribution granulométrique pondérée en volume basée sur la distribution angulaire des rayons X diffusés par les particules $d_{3,Iscat}$.

Applicabilité

141. Cette méthode peut être appliquée aux particules dont la taille se situe approximativement entre 1 nm et 200 nm. La plage de taille précise dépend de l'instrument utilisé (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé), des réglages de l'instrument, et du nanomatériau potentiel (c'est-à-dire sa densité électronique) à analyser.

142. Cette méthode ne permet de distinguer les particules individuelles des agglomérats/agrégats que dans des conditions spécifiques, si le σ_g de la distribution granulométrique est < 1.2, si les particules ont une morphologie uniforme, et si l'on dispose de connaissances préalables sur la taille des particules individuelles. Il convient d'évaluer soigneusement au cas par cas si une distinction entre les particules individuelles et les agglomérats/agrégats est possible ou non.

143. Il est possible de prendre en compte les particules d'un mélange de deux ou plusieurs populations de particules structurellement et chimiquement différentes si les densités électroniques ne sont pas considérablement différentes, mais, sans informations supplémentaires sur les propriétés de ces particules, il n'est pas possible de séparer l'une de l'autre les diffusions des deux populations.

Exigences préalables

144. Éléments nécessaires pour la réalisation de l'essai

© OCDE (2023)

a) Un instrument de diffusion des rayons X aux petits angles, habituellement composé des éléments suivants : source de rayons X, composants optiques, système de collimation, porte-échantillon, arrêt de faisceau, détecteur et unité de calcul.
b) Des échantillons préparés (conformément aux paragraphes 33 et 34 pour la mesure des particules en dispersion) ; toutes les étapes de la préparation des échantillons doivent être consignées.
c) Des informations sur la densité et la composition atomique approximative des particules et du milieu de dispersion.

Déterminants importants

145. Les composants optiques de l'instrument doivent être propres et exempts de poussière avant l'utilisation. Le milieu de dispersion doit être exempt de contamination. L'eau doit être fraîchement déminéralisée et filtrée avant l'utilisation.

146. La plage de concentrations réelle de l'échantillon dépend du contraste de diffusion (composition atomique et densité de l'analyte et de l'agent dispersant), de la concentration de l'échantillon ainsi que du bruit de fond de l'instrument disponible. La sensibilité de la méthode dépend de la densité électronique du matériau à analyser : plus cette densité est élevée, plus la méthode est sensible. Il est recommandé d'analyser les particules à des concentrations différentes afin de déterminer l'existence ou non d'une dépendance systématique vis-à-vis de la concentration. Il faut mesurer au moins deux concentrations, différant d'un facteur 2, pour exclure l'influence de la concentration sur la distribution granulométrique résultante des particules.

147. Un nanomatériau potentiel à large distribution granulométrique ne peut être entièrement caractérisé que si les tailles des particules se situent à l'intérieur de la plage q applicable de l'instrument et si une distribution granulométrique pondérée en volume est suffisante.

148. Dans un mélange de particules qui présentent des densités électroniques sensiblement différentes, les particules ayant la plus faible densité électronique ne seront pas visibles, sauf dans certains cas précis. Cela s'applique également aux particules cœur-coquille lorsque des matériaux ayant des densités électroniques très différentes sont utilisés. Si les densités électroniques ne diffèrent pas radicalement, la méthode peut, dans certains cas, permettre de mesurer tant la coquille extérieure que le cœur intérieur. (Par exemple, un stabilisateur citrate enrobant des nanoparticules d'argent dans l'eau est invisible, mais un stabilisateur polyéthylène glycol enrobant des particules polymères peut être observé.)

Mesurage et évaluation des données

149. Aperçu des opérations requises pour le mesurage :

a. Réchauffer l'instrument : stabiliser la source de rayons X et la température selon les instructions du fabricant.
b. Effectuer un contrôle du fond, mesurer le milieu de dispersion exempt de particules (s'il est disponible).
c. Mesurer l'échantillon (thermiquement stable $\Delta T = \pm 0.1$ °C).

© OCDE (2023)

d. Évaluer les données à l'aide du logiciel disponible, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

150. Il convient de corriger les données brutes avant de les évaluer. Chaque étape du processus de correction doit être effectuée et consignée [62].

a. Correction des effets liés au détecteur : en raison d'imperfections et de limites physiques, le signal détecté peut varier par rapport au signal réel. Les fluctuations d''intensité et les distorsions géométriques doivent être corrigées.
b. Correction de transmission, de temps et d'épaisseur : tenir compte de l'absorption de rayonnement par l'échantillon ; corriger l'intensité mesurée par rapport au temps de mesure ; normaliser l'épaisseur de l'échantillon.
c. Correction de l'intensité absolue : cette correction s'effectue après calibrage de l'intensité à l'aide d'un étalon de calibrage.
d. Correction de fond : on soustrait le fond après avoir effectué les corrections qui dépendent des mesures.
e. Correction de champ plat : correction en fonction de la sensibilité interpixel.
f. Correction d'angle solide et d'efficacité angulaire : correction des variations d'efficacité du détecteur.
g. Correction de polarisation : correction pour tenir compte des différences de probabilité des événements de diffusion pour les faisceaux polarisés et non polarisés.
h. Correction de volume déplacé : correction pour tenir compte de la dispersion de l'échantillon avec une fraction de particules à volume élevé (> 1 %).

151. La courbe de mesure qui en résulte doit être ajustée au moyen d'une approximation sphérique ou, si la forme est connue, selon la morphologie des particules.

© OCDE (2023)

7 Partie spécifique : fibres

Remarques préliminaires et limites

152. Les distributions du diamètre et de la longueur des fibres sont obtenues à partir de méthodes de microscopie électronique sous la forme de distributions en nombre des dimensions géométriques (diamètre et longueur) : x_d et x_l. Actuellement, la seule méthode permettant de déterminer la taille et la distribution de la taille des fibres est la microscopie électronique.

153. Pour les fibres individuelles et les agglomérats de fibres, les extrémités et le parcours de la fibre doivent être visiblement identifiables. Si cette identification visible n'est pas possible, la discrimination des fibres individuelles sur toute leur longueur dans les agglomérats de fibres sera difficile. La mesure de fibres tridimensionnelles sur des images bidimensionnelles sera elle aussi difficile, car ces fibres peuvent ne pas être droites mais enroulées dans deux ou trois dimensions. Pour plus de détails, voir le paragraphe 158.

Microscopie électronique (ME ou, en anglais, EM, *Electron Microscopy*)

Principe de mesure

154. Le principe de fonctionnement des méthodes de microscopie électronique est esquissé aux paragraphes 110 et 111.

155. Les distributions en nombre du diamètre géométrique x_d et de la longueur x_l des fibres sont déterminés par microscopie électronique. En principe, on peut également déterminer un diamètre de Féret, mais ce cas de figure n'entre pas dans le cadre du présent document, car ce diamètre serait principalement régi par la longueur de la fibre. Comme les fibres sont décrites par leur longueur et leur diamètre, le diamètre de Féret n'est pas considéré plus avant.

Applicabilité

156. Cette méthode s'applique d'une manière générale aux fibres de diamètre compris entre 1 nm et 1 000 nm et de longueur pouvant aller jusqu'à 20 µm. La taille minimale de pixel que le microscope électronique utilisé peut atteindre avec fiabilité, c'est-à-dire sa résolution, fixera la limite inférieure de cette méthode pour un instrument particulier. La limite supérieure de mesure de la longueur de la fibre dépendra du rapport d'aspect de la fibre. D'autres considérations sur les rapports d'aspect maximaux sont évoquées en Annexe, Partie D, paragraphe 203. Pour la MET, la CIL aboutit à fixer à 5 µm de longueur moyenne la limite supérieure de mesure de la longueur d'une fibre pour les fibres avec une large distribution de longueur. Cette limitation est détaillée ci-dessous, avec d'autres.

157. Cette méthode ne s'applique qu'aux matériaux qui sont stables sous vide et sous faisceau d'électrons.

© OCDE (2023)

Exigences préalables

158. Les échantillons destinés à la microscopie électronique doivent être préparés selon l'une des trois méthodes décrites au paragraphe 25. L'échantillon final doit être stable sous vide et sous faisceau d'électrons.

159. L'observation d'objets tridimensionnels au microscope électronique pose le problème inhérent de l'interprétation des projections bidimensionnelles d'objets tridimensionnels. Il convient donc de veiller à obtenir des fibres reposant à plat sur le substrat. Par exemple, l'échantillonnage par précipitation électrique n'est pas recommandé pour la détermination de la taille des fibres, car les charges s'accumulent aux extrémités des fibres et les font reposer debout sur le substrat, ce qui conduit à sous-estimer la longueur des fibres.

Déterminants importants

160. Si l'objectif de la mesure est de déterminer le diamètre et la longueur des fibres, il convient de distinguer les catégories suivantes de qualité de préparation pour obtenir des images exploitables :

a. Qualité de préparation optimale
   i. Les fibres sont séparées sans croisements ni avec elles-mêmes ni entre elles.
   ii. Le rapport d'aspect des fibres est tel que la longueur totale des fibres peut être évaluée à partir d'images acquises avec une taille de pixel de ¼ du diamètre des fibres.
   iii. Le nombre d'impuretés et d'autres artefacts sur les images est faible et leur signal se distingue de celui des fibres en taille, forme, texture ou valeur de gris.

   → La mesure entièrement automatisée (voir paragraphe 168) et/ou visuelle des fibres permet de déterminer par paires de descripteurs la longueur et le diamètre de la majorité des fibres.

b. Qualité de préparation acceptable
   i. Les fibres ne sont pas toutes entièrement séparées et peuvent présenter plusieurs croisements, la plupart d'entre eux à un angle suffisamment grand pour que le parcours de chaque fibre individuelle puisse être déterminé.
   ii. Seules quelques fibres sont agglomérées, enchevêtrées ou attachées les unes aux autres.
   iii. Le rapport d'aspect des fibres est tel que la longueur totale des fibres peut être évaluée à partir d'images acquises avec une taille de pixel de ¼ du diamètre des fibres.

   → La mesure visuelle des fibres combinée à un faible niveau d'automatisation (voir paragraphe 168b) permet de déterminer par paires de descripteurs la longueur et le diamètre de la majorité des fibres.

c. Qualité de préparation passable
   i. La qualité est semblable à celle décrite au point b), mais le rapport d'aspect des fibres est plus grand que celui autorisé par la limite fixée sur l'instrument utilisé (voir la partie D de l'Appendice, au paragraphe 203. La longueur et le diamètre peuvent dans ce cas être déterminés à différentes résolutions, comme expliqué au paragraphe 167.d).

   → Une évaluation visuelle de l'image est possible, mais pour la majorité des fibres, la longueur et le diamètre ne peuvent être déterminés que séparément, et non par paires.

d. Qualité de préparation insuffisante
   i. Les fibres sont fortement enchevêtrées ou agrégées, attachées les unes aux autres.

© OCDE (2023)

ii. Les fibres sont sensibles au faisceau d'électrons ou au vide.

iii. Les impuretés et autres artefacts ne sont pas suffisamment distinguables des fibres.

→ L'évaluation visuelle de l'image n'est pas possible. Il faut envisager de recommencer la préparation de l'échantillon.

161. Conditions préalables à la réalisation de l'essai

a. Il convient de disposer d'un microscope électronique à balayage ou d'un microscope électronique à transmission dont la taille de pixel minimale est égale ou inférieure à ¼ du diamètre attendu des fibres.

b. L'échantillon de fibres préparé selon l'une des trois méthodes détaillées au paragraphe 25 doit être examiné à l'aide d'un microscope électronique (soit à balayage, soit à transmission).

c. Préalablement à l'examen, on aura déterminé la taille de pixel optimale. Celle-ci doit permettre de résoudre au microscope le diamètre de la fibre avec un nombre minimum requis de pixels, comme spécifié ci-dessous (voir paragraphe 162.

d. Cette taille de pixel est utilisée pour acquérir et enregistrer des images à partir d'un certain nombre de positions d'échantillon choisies au hasard.

e. Après l'acquisition des images, celles-ci doivent être évaluées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images. On déterminera par paires de descripteurs le diamètre et la longueur d'au moins 200 fibres, c'est-à-dire qu'on mesurera la longueur et le diamètre de chaque fibre individuelle.

f. À partir de l'ensemble des diamètres et des longueurs des fibres, on calculera ensuite les distributions en nombre cumulées [25].

162. Afin de déterminer avec exactitude le diamètre des fibres, un nombre minimal de 4 pixels par diamètre moyen est nécessaire. Ainsi, le diamètre minimal de fibre quantifiable avec exactitude est égal à 4 fois la taille de pixel minimale de l'instrument.

a. Les fibres plus fines que la taille du pixel sont généralement visibles au moins jusqu'à une taille de pixel égale à deux fois le diamètre de la fibre, mais le diamètre réel d'une fibre est ensuite masqué par la taille du pixel. Cela entraîne des erreurs expérimentales liées à la quantification, qui font apparaître les fibres plus épaisses qu'elles ne le sont en réalité. Néanmoins, utiliser une taille de pixel égale à deux fois le diamètre moyen de la fibre permet de tracer des fibres qui sont 8 fois plus longues que si on utilise la taille de pixel correcte pour la détermination du diamètre. Dans les cas où des fibres aussi longues doivent être analysées, on peut suivre la procédure décrite au paragraphe 167.c).

163. Les fibres ayant un rapport d'aspect très élevé peuvent être trop longues pour apparaître sur une seule image. Le rapport d'aspect maximal pouvant être reproduit sur une image dépend de la taille de l'image acquise. Les limites types des rapports d'aspect pour des tailles d'image types sont indiquées à la partie D de l'Appendice, au paragraphe 203. La MET n'a pas pu être validée dans le cadre de la CIL pour les fibres caractérisées à la fois par une longueur médiane > 5 µm et par une large distribution de longueur avec un $\sigma_g > 1{,}5$ (voir paragraphe 21 : elle ne peut pas être recommandée pour la mesure de la taille de ces fibres. Seule la MEB doit être utilisée dans ce cas.

164. Les fibres ayant un rapport d'aspect ≥ 3 doivent être incluses dans l'analyse statistique de la distribution de la taille des fibres.

© OCDE (2023)

Mesurage et évaluation des données

165. Avant toute mesure, l'étalonnage et la maintenance de l'instrument doivent être effectués conformément au manuel d'instructions. Pour plus d'informations, voir [19, 53] pour le MEB et [24, 54] pour le MET.

166. Spécifications pour le comptage des fibres :

a. Seules les fibres dont les deux extrémités sont clairement détectables sont comptées. Les fibres entrecroisées ou agglomérées ne sont comptées que si l'on peut clairement distinguer laquelle des extrémités visibles appartient à une fibre.

b. La longueur de la fibre est évaluée en traçant le parcours de la ligne centrale de la fibre imagée et en déterminant sa longueur.

c. La détermination du diamètre d'une fibre imagée est entachée d'incertitudes expérimentales et d'incertitudes dues à l'évaluation subjective des différences de contraste entre la fibre et le substrat.

   i. La reproductibilité la plus élevée est obtenue si le diamètre de la fibre est évalué automatiquement à partir de traces types de valeurs de gris (voir la Partie D de l'Appendice, au paragraphe 9.

   ii. Si l'évaluation du diamètre d'une fibre est effectuée manuellement, à l'aide d'outils permettant de tracer et de marquer le bord extérieur de la fibre, les images doivent être évaluées en utilisant des niveaux de grossissement élevés pour que les résultats soient reproductibles. Le grossissement de l'image est élevé lorsque les pixels individuels sont visibles dans l'image.

   iii. Il convient d'évaluer le diamètre à au moins 3 positions le long de la fibre et de calculer la moyenne. Les positions choisies doivent ainsi refléter la variation du diamètre sur la longueur de la fibre.

d. Le nombre minimal de fibres à compter est N=200, capturées sur une ou plusieurs images. À partir de ce nombre, on obtient une incertitude qui dépend de la largeur de la distribution, comme illustré à la partie D de l'Appendice, ***Graphique***.

   i. Si les exigences pour réaliser l'essai sont que la médiane ou la moyenne d'une distribution doit être déterminée sans dépasser une certaine incertitude, la mesure de fibres supplémentaires doit être poursuivie jusqu'à ce que l'erreur bootstrap se situe dans l'intervalle d'incertitude requis.

e. Si la majorité des fibres sont résolues avec plus de 4 pixels par diamètre, les fibres qui sont enregistrées avec une résolution inférieure à 4 pixels par diamètre peuvent néanmoins être mesurées. Pour le calcul de la médiane, la surestimation de la taille de ces dernières n'entraîne que des déviations mineures.

f. Les agglomérats ou agrégats de fibres enchevêtrées, dans lesquels le parcours des fibres individuelles ne peut pas être tracé visuellement, sont exclus de cette analyse. Chaque image évaluée doit être inspectée pour vérifier si de tels agglomérats/agrégats sont présents. Sur la base de cette inspection, il convient de consigner le nombre d'images dans lesquelles des agglomérats/agrégats non évaluables sont présents, à titre d'information qualitative sur le degré d'agglomération/agrégation de l'échantillon. Dans les cas où, malgré tous les efforts de préparation, aucune fibre individuelle n'est trouvée, il peut être utile et faisable de mesurer une distribution du diamètre des fibres dans les agglomérats/agrégats.

© OCDE (2023)

167. Effectuer le mesurage conformément à la procédure suivante :

a. Régler correctement les paramètres de l'instrument afin d'obtenir des conditions de faisceau optimales pour une imagerie haute résolution, et désactiver la mise au point dynamique et la correction d'inclinaison.

b. Acquérir plusieurs images à large champ de vision, à des résolutions différentes, pour obtenir un aperçu de la qualité de l'échantillon selon les catégories définies au paragraphe 164 et afin de déterminer la taille de pixel appropriée pour l'évaluation du diamètre et des fibres.

c. Si la qualité de l'échantillon est passable ou meilleure :

   i. Le nombre nécessaire d'images pour évaluer les dimensions d'au moins 200 fibres doit être acquis avec une taille de pixel correspondant à environ ¼ du diamètre moyen attendu des fibres.

   ii. Les images doivent être évaluées à l'aide d'un logiciel d'évaluation d'images, conformément aux spécifications de comptage des fibres définies au paragraphe 170.

d. Si une préparation d'échantillon de qualité passable avec des fibres d'une longueur supérieure au rapport d'aspect maximal de l'instrument mais inférieure à 20 µm ne permet pas la détermination concomitante du diamètre et de la longueur des fibres à une seule résolution, procéder comme suit :

   iii. Acquérir suffisamment d'images avec une taille de pixel de ¼ du diamètre de fibre prédominant pour évaluer le diamètre de 200 fibres.

   iv. Acquérir une deuxième série d'images avec une taille de pixel de 2 fois le diamètre de fibre (cette taille de pixel équivaut à 8 fois la taille de pixel de la première mesure) et évaluer la longueur de 200 fibres.

   v. Consigner dans le rapport la longueur maximale mesurable (qui peut être calculée conformément au paragraphe 4 et noter que les distributions du diamètre et des fibres ont été déterminées dans le cadre de mesures indépendantes, car cette méthode s'écarte du protocole standard.

e. Si la qualité de l'échantillon est insuffisante, optimiser l'étape de préparation de l'échantillon et exécuter de nouveau la mesure.

168. Les mesures de la longueur et du diamètre des fibres peuvent se faire avec différents niveaux d'automatisation (pour plus d'informations, voir [20]).

a. Le plus haut niveau d'automatisation correspond à une segmentation entièrement automatique de l'image, ce qui signifie que les fibres sont automatiquement séparées de l'arrière-plan. La longueur et le diamètre des objets détectés comme étant des fibres peuvent également être déterminés automatiquement. Si ce niveau d'automatisation est disponible, il est possible d'évaluer un plus grand nombre de fibres.

b. Le plus bas niveau d'automatisation consiste à enregistrer automatiquement les paires de descripteurs (longueur, diamètre) dans une feuille de calcul pendant l'évaluation visuelle des images, en utilisant un logiciel de traitement d'images approprié.

Évaluation des données et évaluation de l'incertitude

169. À partir de la liste des valeurs appariées de longueur et de diamètre, on doit calculer la moyenne et la médiane de la distribution de longueur et de la distribution de diamètre. En outre, les valeurs appariées peuvent être utilisées pour calculer un rapport d'aspect pour chaque fibre. Par conséquent, on

© OCDE (2023)

peut obtenir une distribution du rapport d'aspect, et calculer les valeurs moyennes et médianes correspondantes.

170. Comme la plupart des distributions de diamètre et de longueur suivent de près une distribution logarithmique, il est utile de calculer l'écart type géométrique σ_g de la distribution de diamètre, d'une part, et de la distribution de longueur d'autre part, pour caractériser la largeur de chacune. Les valeurs types sont comprises entre 1,5 et 3.

171. La fonction de distribution cumulée doit être utilisée pour évaluer la distribution des dimensions des fibres. Pour plus d'informations sur la représentation graphique d'une distribution granulométrique cumulée, voir [25].

172. Afin de vérifier la reproductibilité, deux distributions cumulées de deux échantillons ou de deux évaluateurs peuvent être comparées à l'aide d'un test d'hypothèse statistique non paramétrique (par exemple, le test bilatéral de Kolmogorov-Smirnov ; voir Annexe, Partie D, paragraphe 202. Le nom du test et le résultat doivent être indiqués dans le rapport d'essai.

173. Incertitude de mesure : il convient d'évaluer et de consigner l'ensemble suivant des composantes de l'incertitude entourant la moyenne et la médiane des distributions du diamètre et de la longueur des fibres. Les valeurs indiquées pour ces différentes composantes sont des critères de qualité : une mesure est valide si ces critères sont respectés.

a) Incertitude associée à l'échantillonnage lors de la préparation de l'échantillon (reproductibilité de la préparation de l'échantillon).
b) Incertitude associée à la méthode. Cette incertitude est estimée à $2\sigma_P < 45\%$ sur la base des résultats de la comparaison interlaboratoire.
c) Incertitude subjective de l'opérateur, correspondant à $2\sigma_{SF} < 25\%$ (déterminée pour la MEB à partir de l'évaluation des images obtenues avec un instrument par deux évaluateurs différents).
d) Incertitude sur la moyenne ou la médiane due à un échantillonnage statistique limité. Cette incertitude peut être évaluée en utilisant la méthode bootstrap (voir Annexe, Partie D, paragraphe 1. Elle dépend du nombre de fibres comptées ainsi que de la largeur de la distribution. Pour les distributions larges avec $\sigma_g = 3.0$, elle est de $2\sigma_{Bt} < 25\%$.
e) L'incertitude de mesure composée peut être calculée en additionnant toutes les composantes de l'incertitude :

$$\sigma_C = \sqrt{\sum_i \sigma_i^2}$$

f) L'incertitude de mesure composée est dominée par le nombre de fibres comptées et l'évaluation subjective. Pour plus d'informations à ce sujet, voir [63].
g) L'incertitude de mesure élargie u se définit comme $u = k\sigma_C$. Avec un facteur d'élargissement $k = 2$, l'incertitude de mesure élargie correspond approximativement à un niveau de confiance de 95 %. Pour plus d'informations à ce sujet, voir [64].

© OCDE (2023)

© OCDE (2023)

8 Matériaux recommandés pour la validation des essais

174. Les méthodes décrites ici ont été validées dans une étude de comparaison interlaboratoire (CIL) [9]. En l'absence d'expérience relative à la méthode de mesure ou au nanomatériau étudié, il est recommandé de pratiquer l'essai au moins une fois sur l'un des nanomatériaux mentionnés dans l'étude CIL ou un matériau de référence certifié.

175. Les références des matériaux d'essai utilisés dans le cadre de la CIL figurent en résumé dans l'Appendice E de la présente Ligne directrice et de façon plus détaillée dans le rapport de validation de la CIL.

© OCDE (2023)

9 Rapport d'essai

176. Le rapport d'essai doit comporter les informations suivantes, lorsqu'elles sont applicables, le point e) étant spécifique des nanoparticules et le point f) des nanofibres ;

a) Nom du laboratoire d'essai
b) Informations sur le nanomatériau potentiel soumis à l'essai et la préparation des échantillons

- Composition chimique, numéro CAS, identification du lot, ou autre numéro d'inventaire des substances chimiques applicable (s'il y a lieu)
- Modification de surface, morphologie, contaminations éventuelles
- Quantité d'échantillon
- Méthode de préparation
  c) si une poudre sèche a été préparée/utilisée : type de substrat utilisé, description de la procédure de préparation
  d) si une dispersion a été préparée/utilisée : milieu de dispersion, procédure de filtration, concentration, agents dispersants, dilution des échantillons, concentration finale des échantillons, procédure de dispersion
  e) si un aérosol a été préparé/utilisé : type de substrat utilisé (pour la ME), méthode de préparation de l'aérosol (type de générateur d'aérosol, concentration, conditions d'humidité, utilisation d'un sécheur à diffusion, par exemple)
- Temps écoulé entre la préparation des échantillons et le mesurage
- S'il y a lieu : autres informations relatives à la préparation des échantillons conformément à la section consacrée à la méthode – particules, voir les paragraphes 33 et 34 ; fibres, voir le paragraphe 162
- S'il y a lieu : marque/modèle de sonicateur, étalonnage de la puissance délivrée (voir plus de précisions sur l'étalonnage in [28], annexe 2), apport d'énergie, puissance indiquée, amplitude et temps de pulsation
- Autres informations spécifiques par méthodes :

CLS	Volume de l'échantillon et concentration injectée (disque)
DMAS	Type de générateur d'aérosol et réglages utilisés ; données relatives au milieu de dispersion utilisé (pureté de l'eau, notamment)

© OCDE (2023)

*sp-ICP-MS**	*Concentration réelle de particules ; système de particules de référence/étalon*

f) Informations sur l'instrument de mesure et les réglages de base de l'instrument

- Marque et modèle d'instrument utilisé
- Logiciel avec son numéro de version, routines logicielles spécifiques (s'il y a lieu)
- Informations spécifiques sur l'instrument, conformément à la section consacrée à la méthode
- Autres informations spécifiques par techniques :

AFM	▪ Substrat d'échantillon utilisé ▪ Pointe ▪ Taille de pixel ▪ Mode de détection (et justification si le mode à contact intermittent n'est pas utilisé)
CLS	▪ Mode de fonctionnement (démarrage en ligne, homogène) ▪ Rayon de mesurage, rayon interne du disque, épaisseur interne du disque (si ces données sont disponibles) ▪ Correction de Mie (indiquer si et comment elle est effectuée) ▪ Source de lumière (photocentrifugeuse) ▪ Type de détection
DLS	▪ Porte-échantillon utilisé ▪ Longueur d'onde du laser
DMAS	▪ Type de DMA / Spécifications ▪ Marque et modèle de détecteur ▪ Système d'entrée : type et spécifications de l'impacteur/du cyclone ▪ Type de sécheur ▪ Plage de mesure / nombre de canaux par décade ▪ Temps de balayage / nombre de balayages ▪ Débits d'air (débit de l'aérosol et débit de l'air entrant dans le DMA, débit de l'aérosol dans le CPC/l'électromètre) ▪ Milieu utilisé pour le CPC ▪ Réglage de la température de la chambre de condensation du CPC ▪ Longueur et diamètre du tuyau entre la source d'aérosol et le système d'entrée du DMAS
PTA	▪ Type de caméra ▪ Longueur d'onde du laser ▪ Fréquence d'images
SAXS	▪ Source de rayons X ▪ Longueur d'onde, brillance (s'il y a lieu) ▪ Distance entre l'échantillon et le détecteur ▪ Détecteur (type, surface, angles possibles)

© OCDE (2023)

*sp-ICP-MS**	▪ *Efficacité du transport*
MEB	▪ Porte-échantillon utilisé ▪ Énergie du faisceau d'électrons ▪ Distance de travail ▪ Taille de pixel ▪ Type de détecteur (électrons secondaires, électrons rétrodiffusés, MEBT, etc.) ▪ Résolution du microscope

MET	▪ Taille des mailles de la grille
	▪ Énergie du faisceau d'électrons
	▪ Ouverture de diffraction
	▪ Paramètres de courant du faisceau
	▪ Courant de la lentille d'objectif
	▪ Taille de pixel
	▪ Type de détecteur
	▪ Mode d'imagerie
	▪ Ouverture de l'objectif du condenseur
	▪ Ouverture de l'objectif
	▪ Temps d'exposition/durée d'acquisition
	▪ Résolution du microscope
	▪ Pour les images obtenues en filtrant l'énergie
	  ▪ Ouverture limitant l'énergie
	  ▪ Fenêtre en énergie
	  ▪ Décalage en énergie

g) Conditions expérimentales (spécifiques par méthodes)

CLS	▪ Vitesse de centrifugation ▪ Gradient de densité et couche tampon utilisés (disque) ▪ Viscosité du milieu de dispersion ▪ Indice de réfraction de l'échantillon et du milieu de dispersion ▪ Température
DLS	▪ Température ▪ Viscosité du milieu de dispersion ▪ Indice de réfraction de l'échantillon et du milieu de dispersion
PTA	▪ Température de l'échantillon ▪ Viscosité
SAXS	▪ Température de l'échantillon ▪ Densité des particules

© OCDE (2023)

	▪ Indice de réfraction de l'échantillon et du milieu de dispersion
MEB	▪ Épaisseur du revêtement (s'il y a lieu)

h) Points spécifiques pour les particules uniquement : rapport de mesurage

- Plage de taille analysée, type de grandeur mesurée selon la méthode, diamètre moyen et médian et, le cas échéant, diamètres modaux et plages de taille sélectionnées pour la détermination des différents diamètres (pour plus de précisions, on consultera la norme ISO 9276-2 [65]).
- Si l'objectif du mesurage impose de transformer les résultats en une grandeur autre que celle qui a été mesurée, il convient de faire figurer dans le rapport les résultats d'origine et les données transformées, en indiquant la formule et les hypothèses sous-jacentes.
- Pour les méthodes n'utilisant pas la ME : dans le cas où le but est de déterminer la taille des particules individuelles, il convient d'apporter la preuve que la procédure de préparation des échantillons a entraîné la désintégration de la majorité des agglomérats (en indiquant par exemple la taille de particule attendue et le raisonnement suivi).
- Résultats types obtenus par la méthode : images, graphiques, par exemple.
- Distribution granulométrique cumulée et distribution granulométrique différentielle des particules (avec description du mode de traitement des plus grandes particules).
- Écart type géométrique représentant la largeur de la distribution log-normale.
- Nombre de mesures individuelles réalisées.
- Autres informations spécifiques par méthodes :

AFM	▪ Au moins 3 images types
DMAS	▪ Corrections appliquées (charge multiple, diffusion, analyse des agglomérats)
DLS	Selon l'instrument utilisé (ici algorithme Cumulants) : ▪ $Z_{average}$ et indice de polydispersité ▪ Réglage de l'atténuateur ▪ Position de mesurage
PTA	▪ Nombre d'images traitées ▪ Nombre de tracés valides ▪ Concentration réelle de particules
SAXS	▪ Modèle appliqué ▪ Facteur de forme utilisé ▪ Plage de q
MEB/MET	▪ Au moins 3 images types ▪ Nombre de particules comptées ▪ Distribution granulométrique des particules selon le diamètre minimal et maximal de Féret et le diamètre circulaire équivalent ▪ Nombre d'agglomérats/agrégats exclus de l'analyse

© OCDE (2023)

	▪ Mode de comptage pour la distribution granulométrique des particules ▪ Pour la comparabilité : distribution granulométrique des particules individuelles uniquement ($d_{0,ecd}$; $d_{0,Fmin}$; $d_{0,Fmax}$) ▪ À titre informatif : distribution granulométrique des agrégats/agglomérats exclus ($d_{0,ecd}$; $d_{0,Fmin}$; $d_{0,Fmax}$) ▪ Préciser si l'analyse a été effectuée manuellement ou de manière automatisée

i) Points spécifiques pour les fibres uniquement : rapport de mesurage

- Au moins trois images types.
- Information sur le degré d'automatisation de l'évaluation des images.
- Liste des valeurs par paires de la longueur et du diamètre et rapports d'aspect d'au moins 200 fibres.
- Nombre de fibres comptées.
- Représentation graphique du diamètre en fonction de la longueur pour le jeu de données évalué.
- Distribution cumulée en nombre de la longueur et du diamètre des fibres, respectivement.
- Longueur, diamètre et rapport d'aspect moyens et médians (on trouvera plus de précisions sur le mode de calcul de la moyenne et de la médiane à partir d'une distribution granulométrique in [65]).
- Établissement du σ_g représentant la largeur de la distribution log-normale, ainsi que de l'incertitude élargie u pour les distributions de longueur, de diamètre et de rapport d'aspect, respectivement.

j) Rapport sur les écarts de mesure pour les particules et les fibres :

- Exactitude calculée par la méthode Bootstrap (cf. paragraphe 1 pour la médiane et la moyenne (AFM, MEB, MET).
- Écarts à la médiane et à la moyenne tels qu'indiqués par le logiciel de l'instrument pour toutes les autres méthodes.
- Écart de répétabilité des diamètres obtenus.
- Incertitude conformément au Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure (GUM) (si disponible) [64].

k) Le cas échéant : résultats obtenus avec des matériaux de référence utilisés à des fins de calibrage ou de comparaison

l) Écarts entre les essais réalisés et les indications de la présente LD

m) Résultats du calibrage actuel et incertitude y afférente

n) Toutes informations et remarques pertinentes pour l'interprétation des résultats

**Note : la méthode sp-ICP-MS est présentée à la partie C de l'Appendice. Bien que les données de la littérature montrent que cette méthode pourrait être valide pour générer des résultats fiables, robustes et reproductibles, il n'a pas été possible, dans le cadre de l'élaboration de cette LD, de procéder à une validation complète pour ce qui est de la cohérence et de la comparabilité des résultats et de leur dépendance vis-à-vis des instruments de mesure.*

© OCDE (2023)

© OCDE (2023)

10 BIBLIOGRAPHIE

1. OECD/ENV/JM/MONO, Physical-Chemical Properties of Nanomaterials: Evaluation of methods applied in the OECD-WPMN Testing Programme, in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, OECD, Editor. 2016, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
2. OECD/ENV/JM/MONO, Inhalation Toxicity Testing: Expert meeting on potential revisions to OECD Test Guide-lines and Guidance Document. Report in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2012, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
3. OECD/ENV/JM/MONO, Ecotoxicology and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines. Expert Meeting Report in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2014, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
4. OECD/ENV/JM/MONO, Report of the OECD Expert Meeting on the Physical Chemical Properties of Manufactured Nanomaterials and Test Guidelines, in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2014, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
5. OECD/ENV/JM/MONO, Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD expert meeting, in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2014, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
6. Rasmussen, K., et al., Developing OECD test guidelines for regulatory testing of nanomaterials to ensure mutual acceptance of test data. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2019. **104**: p. 74-83.DOI: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.008.
7. Rasmussen, K., et al., Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2018. **92**: p. 8-28.DOI: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.10.019.
8. Rasmussen, K., et al., Review of achievements of the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials' Testing and Assessment Programme. From exploratory testing to test guidelines. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2016. **74**: p. 147-160.DOI: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.004.
9. OECD (2022). *Validation report: Development and validation of the Test Guideline on particle size and particle size distribution of manufactured nanomaterials. Series on Testing and Assessment No.352. ENV Publications. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.*

© OCDE (2023)

10. OECD/ENV/JM/MONO, Guidance on Sample Preparation and Dosimetry fot the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials, in OECD Environment, Health and Safety Publications - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials. 2012, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD): https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm.
11. Mech, A., et al., The NanoDefine Methods Manual. Part 3: Standard Operating Procedures (SOPs). 2019, Luxembourg: Publications Office of the European Union.DOI: https://doi.org/10.2760/02910, EUR 29876 EN, JRC117501.
12. Mech, A., et al., The NanoDefine Methods Manual. Part 1: The NanoDefiner Framework and Tools. 2019, Luxembourg: Publications Office of the European Union.DOI: https://doi.org/10.2760/55181, EUR 29876 EN, JRC117501.
13. Mech, A., et al., The NanoDefine Methods Manual. Part 2: Evaluation of methods. 2019, Luxembourg: Publications Office of the European Union.DOI: https://doi.org/10.2760/071877, EUR 29876 EN, JRC117501.
14. Rauscher, H., et al., An overview of concepts and terms used in the European Commission's definition of nanomaterial. 2019, Luxembourg: Publications Office of the European Union.DOI: https://doi.org/10.2760/459136, EUR 29647 EN.
15. Boverhof, D.R., et al., Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety considerations, Regulatory Toxicology and Pharmacology. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2015. **73**: p. 137-150.DOI: https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.001.
16. ECHA, Appendix for nanoforms applicable to the Guidance on Registration and Substance Identification. 2019, European Chemicals Agency: https://echa.europa.eu/documents/10162/17250/how_to_register_nano_en.pdf/f8c046ec-f60b-4349-492b-e915fd9e3ca0
17. EPA Rule, Chemical Substances When Manufactured or Processed as Nanoscale Materials: TSCA Reporting and Recordkeeping Requirements. 2017, Environmental Protection Agency: https://www.federalregister.gov/documents/2017/01/12/2017-00052/chemical-substances-when-manufactured-or-processed-as-nanoscale-materials-tsca-reporting-and
18. Kestens, V., et al., Challenges in the size analysis of a silica nanoparticle mixture as candidate certified reference material. Journal of Nanoparticle Research, 2016. **18**(6): p. 171.DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-016-3474-2.
19. ISO 19749:2021, Nanotechnologies - Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy. 2021: https://www.iso.org/standard/66235.html.
20. ISO 13322-1:2014, Particle Size analysis - Image analysis methods-Part1: static image analysis methods. 2014: https://www.iso.org/standard/51257.html.
21. ISO 24173:2009, Microbeam analysis -- Guidelines for orientation measurement using electron backscatter diffraction. 2009: https://www.iso.org/standard/42052.html.
22. ISO/TR 18196:2016, Nanotechnologies -- Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects. 2016: https://www.iso.org/standard/61734.html.
23. Donaldson, K., R.C. Brown, and G.M. Brown, Respirable industrial fibres: mechanisms of pathogenicity. Thorax, 1993. **48**: p. 390-395.DOI: https://doi.org/10.1136/thx.48.4.390.
24. ISO 21363:2020, Nanotechnologies - Measurements of particle size and shape distributions by transmission electron microscopy. 2020: https://www.iso.org/standard/70762.html.
25. ISO 9276-1:1998, Representation of results of particle size analysis - Part 1: Graphical representation

© OCDE (2023)

1998: https://www.iso.org/standard/25860.html.

26. ISO 9276-3:2008, Representation of results of particle size analysis - Part 3_ Adjustment of an experimental curve to a reference model. 2008: https://www.iso.org/standard/39387.html.
27. Linsinger, T., et al., Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term 'nanomaterial'. JRC Reference Report, 2012.DOI: https://doi.org/10.2787/63490.
28. OECD, Test No. 318: Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media. 2017.DOI: https://doi.org/10.1787/9789264284142-en.
29. ISO/TS 12025:2021, Nanomaterials -- Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols. 2021: https://www.iso.org/standard/73131.html.
30. Babick, F., Report of the potentials of the transformation of non-counting methods size distributions into number weighted size distributions of the constituent particles based on instrument manufacturers algorithms in NanoDefine Technical Report D3.6. 2016: http://www.nanodefine.eu/index.php/nanodefine-publications/nanodefine-technical-reports
31. ISO 26824:2013, Particle characterization of particulate systems -- Vocabulary. 2013: https://www.iso.org/standard/43807.html.
32. OECD, Guidance Document for the Testing of Dissolution and Dispersion Stability of Nanomaterials and the Use of the Date for Further Environmental Testing and Assessment Strategies, in Series on Testing and Assessment. 2020: https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2020)9&doclanguage=en.
33. ISO 14488:2007, Particulate materials — Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties. 2007: https://www.iso.org/standard/76766.html.
34. OECD/ENV/JM/MONO(2012)40, Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials. 2012: https://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/publications-series-safety-manufactured-nanomaterials.htm
35. ISO/TR 16196:2016, Nanotechnologies — Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials. 2016: https://www.iso.org/standard/55826.html.
36. OECD, Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials, in Series on Testing and Assessment. 2020: https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2020)8&doclanguage=en
37. ISO 14887:2000, Sample preparation -- Dispersing procedures for powders in liquids. 2000: https://www.iso.org/standard/25861.html.
38. EFSA Scientific Committee, Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. EFSA Journal, 2018. **7**(16): p. 5327.DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5327.
39. Hodoroaba, V.-D., W.E.S. Unger, and A.G. Shard, Characterization of Nanoparticles - Measurement Processes for Nanoparticles. 2019: Elsevier.DOI: https://doi.org/10.1016/C2017-0-00312-9.
40. CEN/TS 17010:2016, Nanotechnologies - Guidance on measurands for characterising nano-objects and materials that contain them. 2016: https://www.en-standard.eu/pd-cen-ts-17010-2016-nanotechnologies-guidance-on-measurands-for-characterising-nano-objects-and-materials-that-

© OCDE (2023)

contain-them/.

41. Misumi, I., et al., Size measurements of standard nanoparticles using metrological atomic force microscope and evaluation of their uncertainties. Precision Engineering, 2018. **51**: p. 691-701.DOI: https://doi.org/10.1016/j.precisioneng.2017.11.013.
42. ASTM E2859 -11(2017), Standard Guide for Size Measurement of Nanoparticles Using Atomic Force Microscopy. 2017, ASTM International: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E2859.
43. ISO 18747-1:2018, Determination of particle density by sedimentation methods - Part 1: Isopycnic interpolation approach. 2018: https://www.iso.org/standard/63267.html.
44. ISO 18747-2:2019, Determination of particle density by sedimentaiton methods - Part 2: Multi-velocity approach. 2019: https://www.iso.org/standard/66838.html.
45. Kestens, V., et al., Establishing SI-Traceability of Nanoparticle Size Values Measured with Line-Start Incremental Centrifugal Liquid Sedimentation. Separations, 2019. **6**.DOI: https://doi.org/10.3390/separations6010015
46. ISO/TR 19601:2017, Nanotechnologies -- Aerosol generation for air exposure studies of nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA). 2017: https://www.iso.org/standard/65451.html.
47. ISO 15900:2020, Determination of particle size distribution -- Differential electrical mobility analysis for aerosol particles. 2020: https://www.iso.org/standard/67600.html.
48. ISO 28439:2011, Workplace atmospheres -- Characterization of ultrafine aerosols/nanoaerosols -- Determination of the size distribution and number concentration using differential electrical mobility analysing systems. 2011: https://www.iso.org/standard/44697.html.
49. ISO 27891:2015, Aerosol particle number concentration -- Calibration of condensation particle counters. 2015: https://www.iso.org/standard/44414.html.
50. von der Weiden, S.-L., F. Drewnick, and S. Borrmann, Particle Loss Calculator – a new software tool for the assessment of the performance of aerosol inlet systems,. Atmospheric Measurement Techniques, 2009. **2**: p. 479–494.DOI: https://doi.org/10.5194/amt-2-479-2009.
51. ISO 22412:2017, Particle size analysis -- Dynamic light scattering (DLS). 2017: https://www.iso.org/standard/65410.html.
52. ISO 22814:2020, Good practice for dynamic light scattering (DLS) measurements. 2020: https://www.iso.org/standard/73972.html.
53. ISO 16700:2016-08, Microbeam analysis -- Scanning electron microscopy -- Guidelines for calibrating image magnification. 2016: https://www.iso.org/standard/65375.html.
54. ISO 29301:2017, Microbeam analysis -- Analytical electron microscopy -- Methods for calibrating image magnification by using reference materials with periodic structures. 2017: https://www.iso.org/standard/70360.html.
55. Masuda, H. and K. Gotoh, Study on the sample size required for the estimation of mean particle diameter. Advanced Powder Technology, 1999. **10**(2): p. 159-173.DOI: https://doi.org/10.1016/S0921-8831(08)60447-1.
56. Masuda, H. and K. Linoya, Theoretical study of the scatter of experimental data due to particle size distribution. Journal of Chemical Engineering of Japan, 1971. **4**: p. 60-67.DOI: https://doi.org/10.1252/jcej.4.60.
57. ASTM D3849-14a, Standard Test Method for Carbon Black—Morphological Characterization of Carbon Black Using Electron Microscopy. 2014, ASTM International: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D3849.

© OCDE (2023)

58. Klein, T., et al., Traceable measurement of nanoparticlesize using a scanning electron microscopein transmission mode (TSEM). Measurement Science and Technology, 2011. **22(9), 094002**.DOI: http://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/22/9/094002.

59. Grulke, E.A., et al., Size and shape distributions of primary crystallites in titania aggregates. Advanced powder technology : the international journal of the Society of Powder Technology, Japan, 2017. **28**(7): p. 1647-1659.DOI: https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.03.027.

60. Verleysen, E., et al., Evaluation of a TEM based Approach for Size Measurement of Particulate (Nano)materials. Materials, 2019. **12**(14): p. 2274.DOI: https://doi.org/10.3390/ma12142274.

61. ISO 17867:2020, Particle size analysis -- Small-angle X-ray scattering. 2020: https://www.iso.org/standard/69213.html.

62. Pauw, B.R., et al., The modular small-angle X-ray scattering data correction sequence. Journal of Applied Crystallography, 2017. **50**(6): p. 1800-1811.DOI: https://www.doi.org/10.1107/S1600576717015096.

63. ISO 14966:2019, Ambient air — Determination of numerical concentration of inorganic fibrous particles — Scanning electron microscopy method. 2019: https://www.iso.org/standard/36256.html.

64. JCGM100:2008, Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. 2008: https://www.bipm.org/en/committees/jc/jcgm/publications.

65. ISO 9276-2:2014, Representation of results of particle size analysis -- Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions. 2014: https://www.iso.org/standard/57641.html.

66. ISO 11039:2012, Surface chemical analysis -- Scanning-probe microscopy -- Measurement of drift rate. 2012: https://www.iso.org/standard/46603.html.

67. ISO 27911:2011, Surface chemical analysis -- Scanning-probe microscopy -- Definition and calibration of the lateral resolution of a near-field optical microscope. 2011: https://www.iso.org/standard/44421.html.

68. ASTM E2382-04(2020), Standard Guide to Scanner and Tip Related Artifacts in Scanning Tunneling Microscopy and Atomic Force Microscopy. 2020, ASTM International: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E2382.

69. ISO 13318-1:2001, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods -- Part 1: General principles and guidelines. 2001: https://www.iso.org/standard/21704.html.

70. ISO 13318-2:2007, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods -- Part 2: Photocentrifuge method. 2007: https://www.iso.org/standard/45771.html.

71. ISO 13318-3:2004, Determination of particle size distribution by centrifugal liquid sedimentation methods -- Part 3: Centrifugal X-ray method. 2004: https://www.iso.org/standard/31503.html.

72. ASTM E2490-09(2021), Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Photon Correlation Spectroscopy (PCS). 2021, ASTM International: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E2490.

73. ISO/TS 10797:2012, Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using transmission electron microscopy. 2012 https://www.iso.org/standard/46127.html.

74. ISO/TS 10798:2011, Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectrometry analysis. 2011: https://www.iso.org/standard/46128.html.

75. ISO/TS 21383:2021, Microbeam analysis -Scanning electron microscopy - Qualification of the scanning electron microscope for quantitative measurements. 2021:

© OCDE (2023)

https://www.iso.org/standard/70832.html.

76. ISO/TS 22292:2021, Nanotechnologies - 3D image reconstruction of rod-supported nano-objects using transmission electron microscopy. 2021: https://www.iso.org/standard/73048.html.
77. ISO 22493:2014, Microbeam analysis -- Scanning electron microscopy -- Vocabulary. 2014: https://www.iso.org/standard/64932.html.
78. ISO/TS 24597:2011, Microbeam analysis -- Scanning electron microscopy -- Methods of evaluating image sharpness. 2011: https://www.iso.org/standard/55760.html.
79. ISO 19430:2016, Particle size analysis -- Particle tracking analysis (PTA) method. 2016: https://www.iso.org/standard/64890.html.
80. ASTM E2834 - 12(2018), Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). 2018, ASTM International: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E2834.
81. ISO/TS 19590:2017, Nanotechnologies -- Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. 2017: https://www.iso.org/standard/65419.html.
82. ISO/TS 13278:2017, Nanotechnologies -- Determination of elemental impurities in samples of carbon nanotubes using inductively coupled plasma mass spectrometry. 2017: https://www.iso.org/standard/69310.html.
83. Montoro Bustos, A.R., et al., Post hoc Interlaboratory Comparison of Single Particle ICP-MS Size Measurements of NIST Gold Nanoparticle Reference Materials. Analytical Chemistry, 2015. **87**(17): p. 8809-8817.DOI: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01741.
84. Linsinger, T., R. Peters, and S. Weigel, International interlaboratory study for sizing and quantification of Ag nanoparticles in food simulants by single-particle ICPMS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(16): p. 3835-3843.DOI: https://www.doi.org/10.1007/s00216-013-7559-9.
85. Babick, F., et al., How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work. Journal of Nanoparticle Research, 2016. **18**(6): p. 158.DOI: https://doi.org/10.1007/s11051-016-3461-7.
86. Klein, T., et al., Traceable measurement of nanoparticle size using a scanning electron microscope in transmission mode (TSEM). Measurement Science and Technology, 2011. **22**(9).DOI: https://doi.org/10.1088/0957-0233/22/9/094002.
87. Meli, F., et al., Traceable size determination of nanoparticles, a comparison among European metrology institutes. Measurement Science and Technology, 2012. **23**(12).DOI: https://doi.org/10.1088/0957-0233/23/12/125005.
88. Steiger, T. and R. Pradel, COMAR: the international database for certified reference materials—an overview. Accreditation and Quality Assurance, 2015. 20: p. 47–52.DOI: https://doi.org/10.1007/s00769-014-1079-y .
89. Counting small particles in electron microscopy images – proposal for rules and their application in practice, by Harald Bresch , Vasile-Dan Hodoroaba, Alexandra Schmidt, Kirsten Rasmussen, Hubert Rauscher. Published in Nanomaterials, 2022, 12(13), 2238; https://doi.org/10.3390/nano12132238.

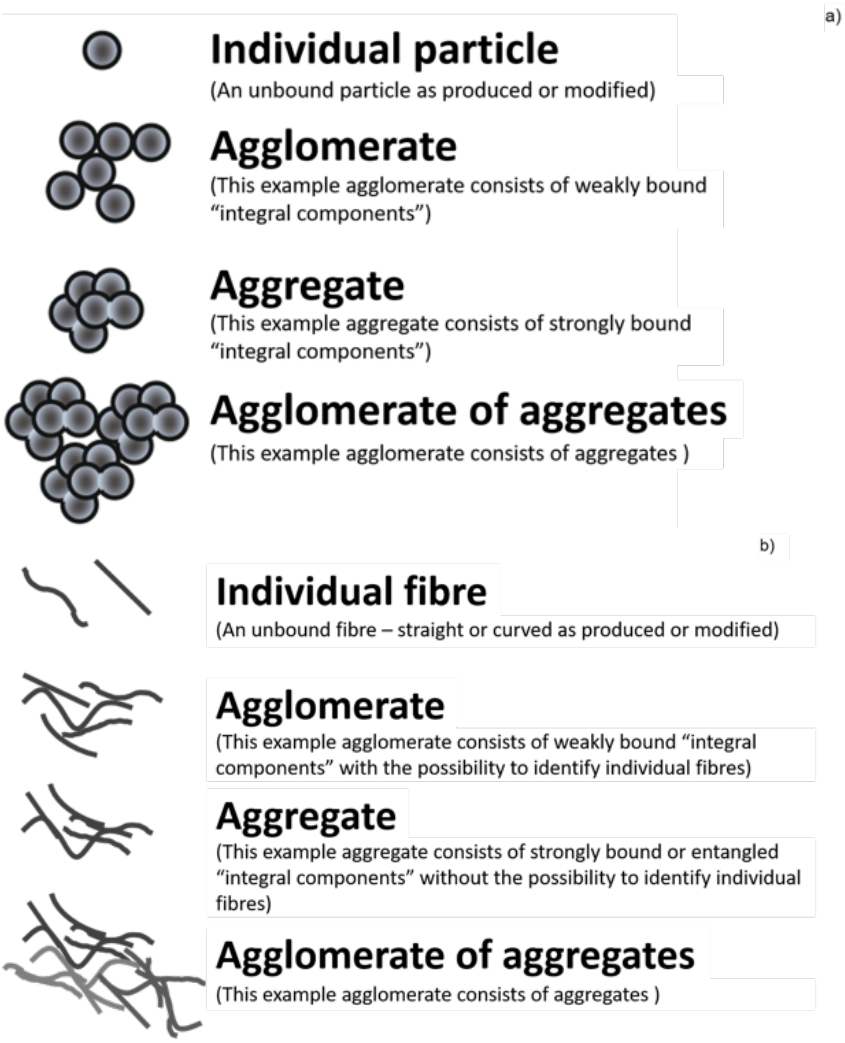
© OCDE (2023)

Appendice

Partie A : Définitions

La figure 1 présente la signification générale des termes utilisés dans cette LD pour désigner les particules et les fibres.

Figure 1 : Illustration de la terminologie utilisée dans cette LD : a) pour les particules ; b) pour les fibres. (N'est pas représentée ici la possibilité que les agglomérats/agrégats contiennent un mélange de particules et de fibres.)



© OCDE (2023)

Le terme de « **particule individuelle** » désigne dans cette LD les particules non liées. Les particules individuelles peuvent être intégrées à des agglomérats ou des agrégats (voir le graphique 1), auquel cas elles sont désignées par le terme d'élément constituant. Les agglomérats peuvent en outre inclure des agrégats plus petits. Le terme de « **fibre individuelle** » désigne dans cette LD les fibres non liées. Les fibres peuvent également se présenter sous forme de fibres attachées les unes aux autres. On peut, dans ce cas, faire la distinction entre agglomérats et agrégats en analysant si les fibres individuelles sont des éléments constituants identifiables (agglomérats) ou non (agrégats).

Aérosol [ISO 80004-6]: système de particules solides ou liquides en suspension dans un gaz

Agglomérat: ensemble de particules ou d'agrégats, ou mélange des deux, faiblement liés, dont la surface externe résultante est sensiblement égale à la somme des surfaces de chacun des éléments qui le composent

Agrégat: particule composée de particules fortement liées ou fusionnées, dont la surface externe résultante peut être significativement plus petite que la somme des surfaces calculées de chacun des éléments qui la composent

Diamètre aérodynamique d'une particule [ISO 16000-34:2018]: diamètre d'une sphère de masse volumique 1 g/cm^3 possédant la même vitesse terminale de chute dans l'air calme liée à la gravité que celle de la particule, dans les mêmes conditions de température, de pression et d'humidité relative

Diamètre circulaire équivalent d_{ecd} [ISO 21363:2020; 3.4.7]: diamètre d'un cercle ayant la même surface que l'image projetée de la particule

EXEMPLE : Le diamètre circulaire équivalent est :

$$ecd = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}}$$

où A est la surface de la particule.

Diamètre de Féret [ISO 10788:2014, 2.1.4]: distance entre deux lignes parallèles tangentes au périmètre d'une particule

Diamètre de Féret minimal/maximal [ISO/TR 945-2:2011, 2.1]: longueur minimale/maximale d'un objet quelle que soit la direction

Diamètre équivalent [ISO 80004-6:2013; 3.1.5]: diamètre d'une sphère qui donne une réponse identique à celle obtenue avec la particule mesurée, via une méthode de mesure de la taille de la particule

© OCDE (2023)

Dispersion: système hétérogène dans lequel une matière finement divisée est répartie dans une autre matière

Distribution granulométrique: distribution de la quantité de particules (basée sur le nombre, la masse ou le volume, par exemple) en fonction de leur taille

Échelle nanométrique: gamme de taille définie par un organe législatif ou un organisme de normalisation, par exemple, pour son usage spécifique

Élément constituent: particule ou fibre individuelle qui fait partie d'un agglomérat ou d'un agrégat

Éprouvette: échantillon immobilisé sur un substrat aux fins d'analyse

Fibre: objet particulaire ayant deux dimensions latérales sensiblement égales $x_d \coloneqq x_1 \cong x_2$ (les diamètres de la fibre) et une troisième dimension longitudinale x_l (la longueur de la fibre) au moins trois fois supérieure à x_d. En d'autres termes, une fibre est un objet présentant un rapport d'aspect

$$\frac{x_l}{x_d} \geq 3$$

Mesurande: grandeur soumise à mesurage

Nano-objet: portion discrète de matériau dont une, deux ou les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique

Nanoparticule : nano-objet dont les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et dont les longueurs du plus grand et du plus petit axes ne diffèrent pas de façon significative

Particule: élément de matière isolé possédant des limites physiques définies

Rapport d'aspect: rapport de la longueur (la dimension la plus longue) d'une particule à sa largeur (la dimension la plus courte)

Taille de particule: la taille des particules, agrégats ou agglomérats est indiquée en micromètres (µm) ou en nanomètres (nm). La taille de particule mesurée dépend de la méthode de mesure utilisée.

Pixel [ISO 12640-2:2004; 3.6]: plus petit élément d'une image pouvant être traité de façon unique, qui est défini par ses coordonnées spatiales et codé avec des valeurs de couleurs

Suspension [ISO 4618:2014-01]: mélange hétérogène de matériaux comprenant un liquide

© OCDE (2023)

et un matériau solide finement dispersé

© OCDE (2023)

Partie B : Normes disponibles relatives aux méthodes décrites dans cette LD

Microscopie à forme atomique (AFM)

1) ASTM E2859 -11[42] ; ISO 11039:2012[66] ; ISO 27911:2011[67] ; ASTM E2382 - 04 [68]

Sédimentation par centrifugation en phase liquide (CLS)/Ultracentrifugation analytique (AUC)

2) ISO 13318-1:2001[69] ; ISO 13318-2: 2007[70] ; ISO 13318-3:2004[71]

Système d'analyse différentielle de mobilité électrique (DMAS)

3) ISO/TS 12025:2012[29] ; ISO 15900:2009[47] ; ISO/TR 19601:2017[46] ; ISO 27891:2015[49] ; ISO/TS 28439:2011[48]

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

4) ISO 22412:2017[51] ; ASTM E2490-09[72] ; ISO 22814:2020[52]

Microscopie électronique (ME)

5) ISO 10797:2012 [73] ; ISO 10798:2011[74] ; ISO 16700:2017[53] ; ISO 19749[19] ; ISO 21363[24] ; ISO 21383 [75] ; ISO/TS 22292[76] ; ISO 22493:2014[77] ; ISO/TS 24597:2011[78] ; ISO 29301:2017[54] ; ISO 13322-1:2014[20]

Analyse par traçage des particules (PTA)

6) ISO 19430:2016[79] ; ASTM E2834-12[80]

Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

7) ISO 17867:2015[61]

Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICP-MS)

8) ISO/TS 19590:2017[81] ; ISO/TS 13278:2017[82]

© OCDE (2023)

Partie C : Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (sp-ICP-MS)

1. Cette méthode est connue pour être opérante sur des matériaux très spécifiques. Une bonne applicabilité a été démontrée pour les particules d'or [83] et d'argent [84]. Des résultats raisonnables ont également été obtenus dans l'analyse de l'oxyde de titane [85]. Selon ces données de la littérature, cette technique pourrait être valide pour générer des résultats fiables, robustes et reproductibles sur la distribution granulométrique des particules citées. Cependant, il reste à établir que ces résultats ne sont pas influencés par les instruments de mesure utilisés. Soulignons que pour cette méthode, il n'a pas été possible, dans le cadre de l'élaboration de la présente LD, de procéder à une validation complète pour ce qui est de la cohérence et de la comparabilité des résultats et de leur dépendance vis-à-vis des instruments de mesure. Seuls quelques résultats ont été soumis à la CIL. Néanmoins, compte tenu de l'importance de cette méthode pour certains usages et de la validation de son applicabilité à des nanomatériaux spécifiques, elle a été conservée dans cette partie de l'Appendice.

Principe de mesure : sp-ICP-MS

2. Une dispersion dans un liquide est nébulisée dans un plasma à couplage inductif où les particules sont vaporisées, atomisées et ionisées, et les atomes ionisés sont détectés dans un spectromètre de masse. Les signaux transitoires sont enregistrés par une méthode de traitement rapide du signal (durées d'acquisition courtes) qui donne des pics représentant une seule particule (une particule par événement). Dans la méthode sp-ICP-MS, une dispersion extrêmement diluée de matériau d'essai est introduite dans l'ICP-MS de telle sorte que statistiquement, une seule particule entre dans l'ICP dans un intervalle de temps donné. Pour plus d'informations sur cette méthode, on trouvera à la partie B de l'Appendice, au paragraphe 8), la liste des normes applicables.

3. La distribution granulométrique obtenue est la distribution en nombre du diamètre sphérique équivalent des particules, établi sur la base de leur masse, $d_{0,mass}$.

Applicabilité

4. La CIL accompagnant cette LD a révélé que les résultats de cette méthode dépendaient fortement des instruments de mesure utilisés. Des recherches complémentaires seront nécessaires pour déterminer clairement les points les plus sensibles de l'analyse par sp-ICP-MS. On manque actuellement d'étalons précis et exacts qui permettraient aux utilisateurs de parvenir à des résultats comparables et fiables sur la distribution des tailles de particules. L'utilisation de cette méthode pour la distribution granulométrique des particules doit encore être validée.

5. Cette méthode peut être appliquée aux particules contenant des métaux/métalloïdes dans la gamme de taille de 10 nm à 1000 nm et plus. La plage granulométrique précise, en particulier la limite de taille inférieure, dépend de l'instrument utilisé (on consultera les spécifications techniques de l'équipement utilisé) et du matériau à analyser (masse atomique, notamment). La sensibilité dépend en outre de l'abondance naturelle des isotopes. Un isotope rare ne donnera qu'un signal faible comparé à un isotope courant.

© OCDE (2023)

6. Le matériau étudié doit être dispersible dans un milieu aqueux pour que la méthode sp-ICP-MS soit applicable. La plage de concentration requise dépend fortement de la composition élémentaire et de la taille des particules du matériau étudié.

7. Cette méthode de mesure ne permet pas de faire la distinction entre les particules individuelles, les agglomérats et/ou les agrégats. Il est possible de prendre en compte les particules d'un mélange de deux types ou plus de particules structuralement et chimiquement différentes si l'on dispose de détecteurs idoines et que chaque type de particule peut être détecté avec un rapport signal-bruit satisfaisant.

8. La gamme de matériaux qui peuvent être analysés par sp-ICP-MS est limitée aux matériaux composés d'éléments chimiques de masse atomique suffisamment élevée pour que le rapport signal-bruit soit satisfaisant dans les tailles de particules considérées, tels que les nanomatériaux inorganiques. La densité du matériau doit être connue.

Exigences préalables

9. Éléments nécessaires pour le mesurage

   a Un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif dont les durées d'acquisition sont ≤ 10 millisecondes, avec un logiciel pouvant restituer le résultat d'analyse pour chaque durée d'acquisition (mode transitoire, par exemple, ou mode particule unique, s'il est disponible).

6. Échantillons préparés (conformément aux paragraphes 33 et 34. Toutes les étapes de préparation des échantillons doivent être décrites dans le rapport.
7. Densité des particules à analyser.
8. Un nanomatériau de référence (particules d'Au, par exemple), pour la détermination de l'efficacité de transport.
9. Un étalon de calibrage pour le test de linéarité.

Remarques complémentaires

10. L'efficacité de transport doit être déterminée sur un nanomatériau de référence (particules d'Au, par exemple) et doit être supérieure à 1 %. Si l'efficacité de transport est inférieure, le nébuliseur, sa position et le débit du gaz de nébulisation doivent être réexaminés.

11. L'instrument doit être calibré avec un étalon de calibrage choisi selon le nanomatériau potentiel à analyser. La courbe de calibrage doit avoir un coefficient de corrélation > 0.99. Une stratégie de calibrage appropriée est nécessaire pour relier l'intensité du pic des particules individuelles à l'information relative à la masse. Les deux démarches couramment utilisées à cet effet sont soit le calibrage par des nanomatériaux étalons, soit l'emploi de solutions étalons et la détermination des efficacités de transport.

12. Nombre de particules détectées : pour les particules dont la distribution granulométrique est étroite ($\sigma_g \leq 1.5$), 300 particules suffisent ; pour les particules dont la distribution granulométrique est large ($\sigma g > 1.5$), il convient de mesurer au moins 700 particules (voir le paragraphe 122.

13. Mesure des particules dont la distribution granulométrique est large : les petites particules pourraient être assimilées aux concentrations de fond. Avant le mesurage, il convient de

© OCDE (2023)

fractionner l'échantillon, en utilisant par exemple le fractionnement par couplage flux-force (FFF, *Field Flow Fractionation*) / le fractionnement par couplage flux-force asymétrique et à force centrifuge (AF4, *Asymetrical Flow and centrifugal Field Flow Fractionation*).

14. Le haut degré de dilution requis pour les dispersions pose un problème de dissolution, ou de dissolution partielle, des particules. La technique étant très sensible, la contamination du milieu de dispersion se traduit par un mauvais rapport signal-bruit.

Mesurage et évaluation des données

15. Aperçu des étapes de mesurage :

1. Vérifier le bon fonctionnement de l'instrument.
10. Déterminer l'efficacité de transport – sur un étalon de taille et de concentration connues, ou un étalon de taille connue.
11. Déterminer la linéarité de la réponse.
12. Déterminer le niveau d'un blanc.
13. Mesurer le matériau de l'échantillon.
14. Convertir les données.
15. Évaluer les données au moyen du logiciel fourni avec l'instrument ou d'un logiciel externe approprié, dûment validé, donnant une vue cumulée de la distribution granulométrique.

© OCDE (2023)

Partie D : Détails de la détermination de l'incertitude par la méthode du bootstrap et information complémentaire concernant les fibres

Détermination de l'incertitude par bootstrap

1. Pour calculer l'incertitude statistique qui entoure la médiane de la distribution granulométrique dans les méthodes microscopiques, il est recouru à la méthode du bootstrap. Cette méthode de ré-échantillonnage permet d'estimer les valeurs médianes avec un intervalle de confiance de 95 %, sans avoir préalablement formulé d'hypothèse sur une forme quelconque de distribution. Les nombreux logiciels d'évaluation statistique qui appliquent cette méthode requièrent uniquement des données d'entrée sur les paramètres définis ci-dessous.

2. Il est recommandé de procéder comme suit :

   1. Tirer au sort 1 000 échantillons avec remise de l'échantillon initial de taille N (par exemple, N = 300 ou 700 dans le cas des particules, N = 200 dans le cas des fibres).

16. Calculer les valeurs médianes du diamètre et de la longueur (le cas échéant) propres à chaque échantillon.
17. Rejeter les 2.5 % des valeurs les plus faibles et les 2.5 % des valeurs les plus élevées. Les valeurs restantes constituent l'intervalle de confiance de 95 %.

Comparaison granulométrique des deux échantillons

3. Il convient de procéder à un test d'hypothèse statistique non paramétrique pour établir si deux distributions granulométriques obtenues à partir des mesures du même matériau suivent la même loi. Il est recommandé de recourir au test bilatéral de Kolmogorov-Smirnov, qui permet de comparer deux listes de valeurs granulométriques de taille différente et de vérifier l'hypothèse selon laquelle ces deux listes proviennent de la même distribution : si la probabilité qu'elle soit vraie est inférieure à 1 % (p<0.01), l'hypothèse est rejetée ($\alpha < 0.01$). Ce test est utilisé dans un grand nombre de logiciels d'évaluation statistique.

Rapport d'aspect maximal

4. Il est en principe possible de visualiser une fibre dans une image à condition que sa longueur soit inférieure à la plus grande longueur de l'image. Cependant, les chances de saisir les deux extrémités d'une fibre de longueur comparable à celle du plus long côté de l'image sont nulles quand on retient une position d'image de manière aléatoire. On considère donc qu'il est rendu compte des fibres avec une robustesse statistique satisfaisante dès lors que la longueur de la fibre n'excède pas un tiers du nombre de pixels correspondant au plus petit côté de l'image $\mathrm{n_pix_s}$. Comme le diamètre d'une fibre est représenté par 4 pixels, son rapport d'aspect maximal peut être estimé par la formule :

$$rapport\ d'aspect\ maximal\ = \frac{n_pix_s}{3 \times 4}$$

5. On trouvera des exemples d'images rectangulaires typiques au format 4:3 dans le ***Tableau 5***.

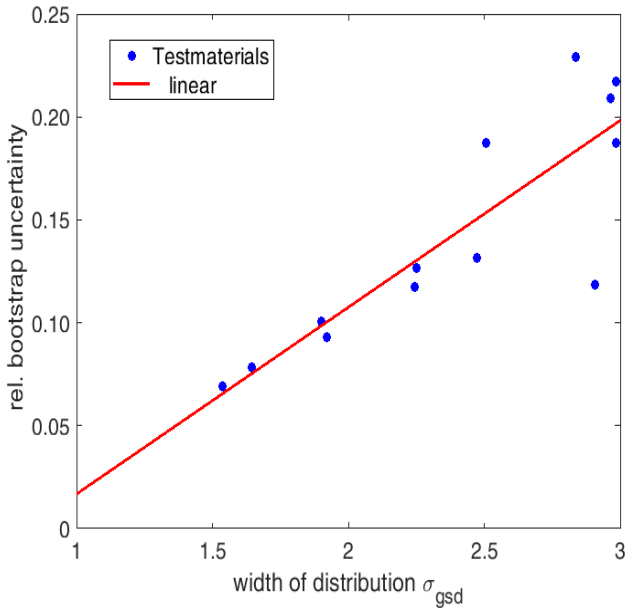
© OCDE (2023)

Tableau 5 : Rapport d'aspect maximal d'une fibre aux fins de la détermination par paire de sa longueur et de son diamètre en fonction de la taille de l'image

Taille de l'image	Rapport d'aspect
20 Mpix (n_pix_s = 3840)	320
5 Mpix (n_pix_s = 2560)	213
1 Mpix (n_pix_s = 1280)	107

L'incertitude calculée par bootstrap dépend de la largeur de la distribution, si le nombre de fibres comptées est 200

Graphique 2 : Incertitude entourant la valeur médiane d'une distribution log normale d'au moins 200 valeurs, calculée par bootstrap pour différentes largeurs de distribution.



6. À partir d'un certain nombre de mesures d'essai effectuées sur des matériaux de distributions granulométriques différentes, on calcule l'incertitude en fonction de la largeur de la distribution à l'aide de la méthode du bootstrap. La ligne rouge sert de référence. On constate que l'incertitude statistique peut être approximée comme une fonction linéaire de la largeur de la distribution granulométrique si on compte N = 200 fibres.

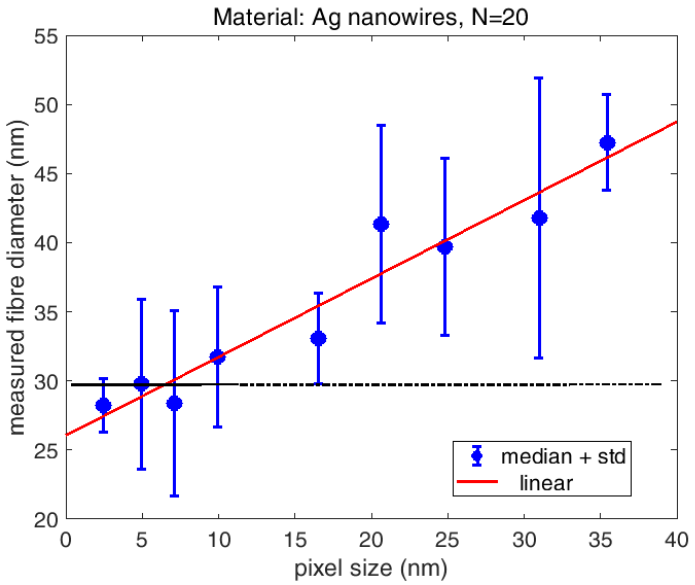
Le diamètre mesuré dépend de la taille de pixel

7. La résolution des images (nombre de pixels par nanomètre) influe sur le diamètre mesuré. Pour vérifier la visibilité des fibres, on a utilisé des images d'une taille de pixel supérieure au diamètre de la fibre considérée. Par exemple, des images de différentes définitions de nanofils en

© OCDE (2023)

argent de 28 nm d'épaisseur ont été prises, et le diamètre de N = 200 fibres a été évalué en fonction de la taille de pixel. Le résultat est présenté dans le ***Graphique*** . Une fibre est détectable même lorsque la taille d'un pixel est égale à plus de deux fois son diamètre. En revanche, le diamètre mesuré augmente avec la taille de pixel, ce qui signifie que sa valeur est surestimée. Pour prévenir une telle surestimation et garantir la fiabilité des résultats, la taille de pixel retenue pour les mesures devrait être telle que le diamètre moyen d'une fibre devrait être au moins égal à 4 pixels (voir paragraphe 166. Le rapport de validation [9] contient des éléments supplémentaires à l'appui de cette valeur.

8. Graphique 1 : Le diamètre mesuré d'une fibre dépend de la taille de pixel de l'image

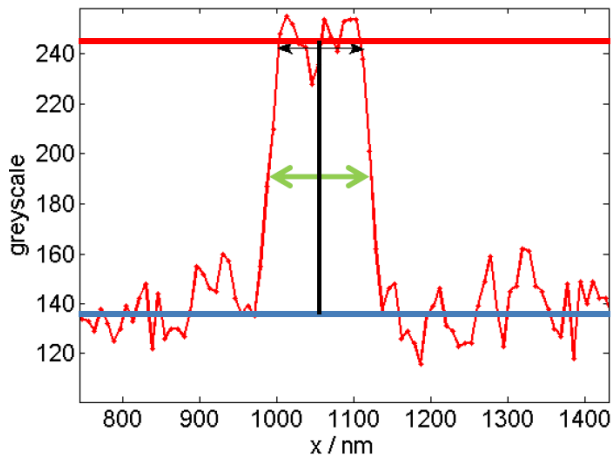


Évaluation du diamètre d'une fibre à partir des traces de valeur de gris

9. Pour obtenir des mesures reproductibles du diamètre d'une particule/fibre tout en limitant au maximum l'influence de l'évaluateur, il est recommandé d'évaluer le diamètre de la particule/fibre à partir des traces de valeur de gris observées à travers la particule. Le ***Graphique*** montre une trace typique. Il est crucial de définir la hauteur à laquelle évaluer la largeur du pic du profil des valeurs de gris. Le paramètre optimal dépend de la nature et de la taille du matériau [27, 86, 87]. Une solution pragmatique consiste à mesurer la largeur du pic à mi-hauteur entre le niveau de bruit (ligne bleue) et la hauteur moyenne de pic (ligne rouge). Cette ligne est figurée par une flèche verte sur le **Graphique 4**

Graphique 4 : Valeur de gris typique obtenue à partir d'une image MEB. Le diamètre de la fibre est défini comme la largeur de la fibre à mi-hauteur du pic. Niveau de bruit (ligne bleue), hauteur du pic (ligne rouge), diamètre de la particule/fibre (ligne verte)

© OCDE (2023)


240
220
200
180
160
140
120
greyscale
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
x / nm

© OCDE (2023)

Partie E : Liste des matériaux utilisés dans le rapport de validation

Tableau 6: Résumé des matériaux (particules) testés avec leur méthodes respectives.

Méthode	Ag[1]	SiO_2[2]	SiO_2[3]	ZnO[4]	PSL Mix[5]	TiO_2[6]	PSL Mix[7]
diamètre (nm)	17 nm	20 nm	50 nm	~100 nm	90/125 nm	~250 nm	80/800 nm
DLS	X	X	X	X	X	X	
CLS	X	X*	X*	X	X	X	X
PTA	X			X	X	X	
SAXS	X	X	X		X		
AFM			X	X	X		
TEM	X	X	X	X	X	X	X
SEM	X	X		X	X	X	X
DMAS	X	X	X		X	X	X

Tableau 5: Résumé des matériaux (fbres) testées et les propriétés liées à leur taille, σ_{GSD} étant la déviation géométrique standard, fournie par le fabricant (*) et la validation propre des valeurs médianes (+) effectuées en MEB.

Méthode	Au[8]	Ag[9]	MWCNT[10]	ZnO[11]	SiC[12]
longueur (µm)	0.045*	0.8+	<15* 1.0+	5-50* 5.4+	50-100* 7.2+
diamètre (nm)	10*	20* 25+	10-30* 30+	50-120* 90+	100-600* 140+
MEB	X	X	X	X	X
MET	X	X	X	X	X

Par ailleurs, les nanomateriaux de référence certifiés valides et disponibles peuvent être trouvés dans la base de données internationale sur les matériaux de référence COMAR, qui est une coopération internationale de 16 instituts. La base de données est accessible via le permalien : www.comar.bam.de.

[1] Fabricant – Product labelling: Not purchasable
[2] Fabricant: KRISS – Product labelling: CRM 301-01-002
[3] Fabricant: KRISS – Product labelling: CRM 301-01-001
[4] Fabricant: JRC – Product labelling: JRCNM62101a
[5] Fabricant: Polysciences – Product labelling: Custom made mixture of Cat. 64009 and Cat. 64011 (1:1)
[6] Fabricant: JRC – Product labelling: IRMM 388
[7] Fabricant: Polysciences – Product labelling: Custom made mixture of Cat. 64008 and Cat. 64025 (2:1)
[8] Fabricant: Sigma-Aldrich – Product labelling: 716839
[9] Fabricant: Novarials – Product labelling: NovaWire-Ag-A20
[10] Fabricant: Arry International Group Ltd. – Product labelling: ARIGM001
[11] Fabricant: ACS – Product labelling: NWZO01A5
[12] Fabricant: ACS – Product labelling: NWSC0202

© OCDE (2023)

Partie F : Sigles et abréviations

AFM	*Atomic Force Microscopy* (Microscopie à force atomique)
AUC	*Analytical Ultracentrifugation* (Ultracentrifugation analytique)
CIL	Comparaison interlaboratoire
CLS	*Centrifugal Liquid Sedimentation* (Sédimentation par centrifugation en phase liquide)
CPC	Compteur de particules à condensation
d	Diamètre
DLS	*Dynamic Light Scattering* (Diffusion dynamique de la lumière)
DMAS	*Differential Mobility Analysis System* (Système d'analyse différentielle de mobilité électrique)
EDX	*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy* (Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie)
FFF/AF4	*Field Flow Fractionation /Asymmetric Field Flow Fractionation* (fractionnement par couplage flux-force / fractionnement par couplage flux-force asymétrique).
GTCN	Groupe de travail des coordinateurs nationaux du programme sur les lignes directrices pour les essais
GTNM	Groupe de travail sur les nanomatériaux manufacturés
GUM	Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure
ISO	Organisation internationale de normalisation
LD	Ligne directrice de l'OCDE pour les essais
MCNN	Moindres carrés non négatifs
ME	Microscopie électronique
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie électronique à transmission
µm	Micromètre
min	Minute
MRC	Matériau de référence certifié
N	Nombre de particules
nm	Nanomètre
NTA	*Nanoparticle Tracking Analysis* (Analyse par traçage des nanoparticules)
PTA	*Particle Tracking Analysis* (Analyse par traçage des particules)
q	Vecteur de diffusion
SAXS	*Small-Angle X-Ray Scattering* (Diffusion des rayons X aux petits angles)
$2\sigma_{Bt}$	Incertitude liée à l'utilisation du test Bootstrap
σ_C	Incertitude de mesure composée
σ_g	Écart type géométrique
$2\sigma_P$	Incertitude liée à la méthode
$2\sigma_{SF}$	Incertitude liée à l'opérateur

© OCDE (2023)

sp-ICP-MS	*Single Particle Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (Analyse de particules individuelles par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif)
T	Température

© OCDE (2023)