Fysisk-kemiske data til at identificere, kategorisere og risikovurdere tekniske nanomaterialer
ï
første spæde svar på de regulatoriske spørgsmål

Senior Researcher Keld Alstrup Jensen

(kaj@nrcwe.dk)

FORSKNINGSCENTER FOR ARBEJDSMILJØ

NATIONAL RESEARCH
CENTRE FOR THE WORKING ENVIRONMENT

A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials

NANOREG

NANoREG

A common European approach to the regulatory testing of Manufactured Nanomaterials

Total budget ca. 50 Mio ú (ca. 67.5 Mio $); 20% from EU

Project duration: 42 Months
(started March 2013; End August 2016)

Ca. 62 partners from 16 European countries

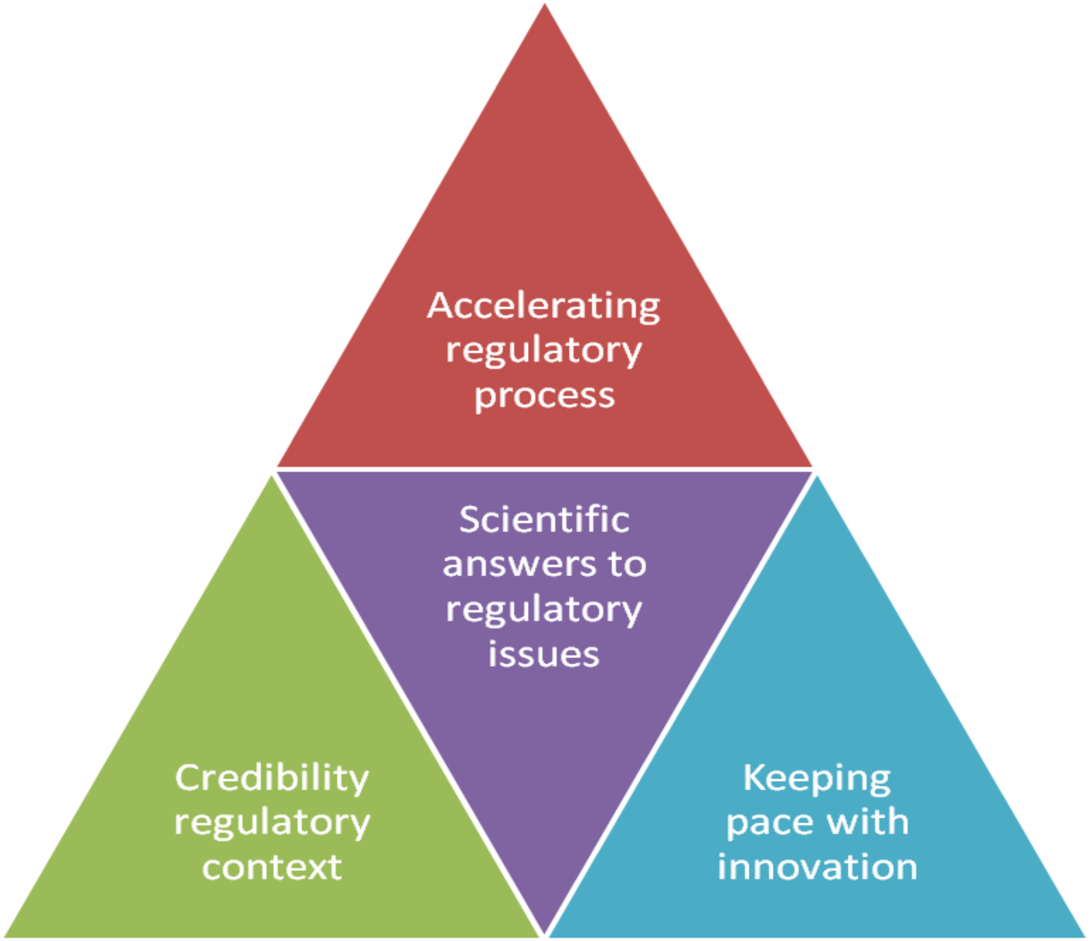
14 EU member states
(AT, BE, DE, DK, ES, FI, FR, IR, IT, NL, PT, SE, UK; Greece is incoming)
2 associated states: (CH, NO),
1 PAN-EU: JRC

Formalized international collaboration with a.o.: South Korea, Brazil, OECD, ISO and ECHA

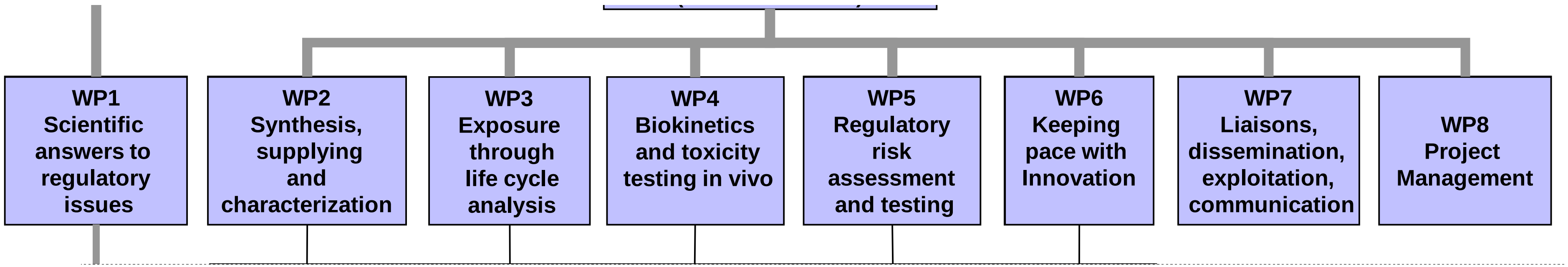
Coordinator: Tom van Teunenbroek
Ministry of the Environment, NL

A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials

Key Objectives



NANoREGôs Organisational Structure



WP2: Synthesis, supplying and characterization

Leader: Keld Alstrup Jensen (NRCWE, DK)

Main objectives of WP2

1) Synthesis and procurement

- availability and key characteristics of 19 core MNM (Total >80 MNM including additional 15 different CNTs)

2) Identification of MNM according to the EC regulatory definition

- number size-distribution, VSSA, MN categorization and nomenclature

3) NM Characterization SOPs for regulatory purposes

- SOPs supporting key OECD TGs and potential future methods

4) Test item preperation, exposure, dose and fate for regulatory purposes and toxicology

- technical guidance to WP3-WP5, benchmark values, methods and exposure characteristics in vivo inhalation, in vitro and ecotox studies

Regulatory questions to NANoREG with relevance for characterization

(http://nanoreg.eu/images/2015_04_20_NANoREG_Factsheet_D1.1.pdf)

?1Measurement and characterization - Identification: How can MNMs be identified according to the EC recommendation for a definition of MNMs and for regulatory purposes. (Plus evaluation and revision of OECD TGôs)

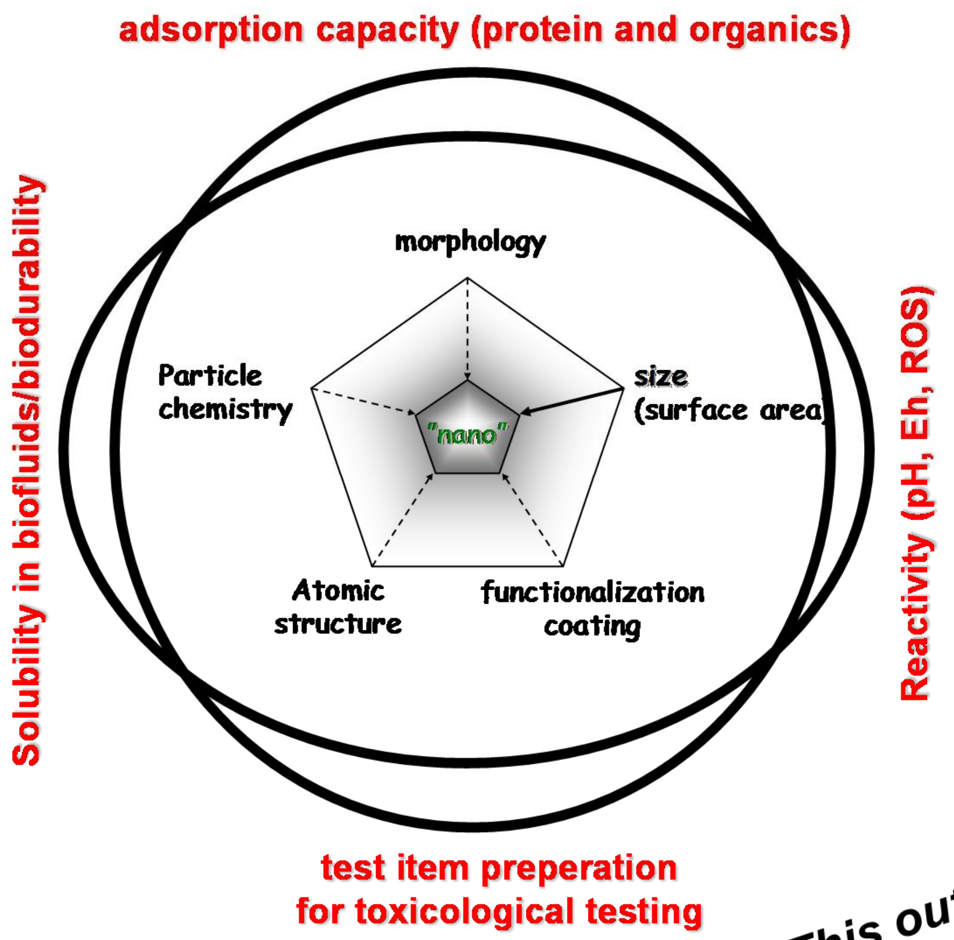
?2Measurement and characterization: Could an "intelligent characterisation strategy" be defined? What are the relevant features to characterise MNMsé .? What SOPs should be developed/used to determine the physico-chemical characteristics of MNMs?

?3Characterisation/Transformation: What testing should be performed to identify surface modifications that occur once a MNM has been released into the environment or taken up into the body? How can transformation, including agglomeration, surface modification, dissolution and incineration, be determined?....

?5Extrapolation and grouping: Should / could guidance be based exclusively on physical-chemical properties é é .. and mechanistic information (as Mode of Action) be used é and how?

?6Fate, persistence and long-term effects: How will coatings or surface modifications or the bio-based nature of the MNM affect biopersistence / biodegradability rates?

Aims WP2: Establish and document SOPs for regulatory characterization needs



SOPs for EC definiton of MNM
SOPs for revision of OECD TGs
SOPs for new CEN or TGs
SOPs for test item preperation
Methods for in vivo testing
Methods for in vitro testing
Methods for ecotox testing

<u>Methods targeted</u>
Transfer to NANoREG WPs
OECD
CEN
ISO
é é

This outcome makes regulation operational

FORSKNINGSCENTER FOR ARBEJDSMILJØ

Europakommissionens forslag til regulatorisk definition af et nanomateriale

http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DA/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=DA

Stk. 2: **»Nanomateriale«**: et naturligt, tilfældigt opstået eller fremstillet materiale, der består af partikler i ubundet tilstand eller som et aggregat eller som et agglomerat, og hvor mindst 50 % af partiklerne i den antalsmæssige størrelsesfordeling i en eller flere eksterne dimensioner ligger i størrelsesintervallet 1-100 nm.

Stk. 3: Uanset stk. 2 bør fullerener, grafenflager og enkeltvæggede carbonnanorør med en eller flere eksterne dimensioner på under 1 nm betragtes som nanomateriale.

Stk 5. Hvor det er teknisk muligt og nødvendigt i specifik lovgivning, kan overensstemmelse med definitionen i stk. 2 bestemmes på basis af det specifikke overfladeområde volumenmæssigt. Et materiale bør betragtes som henhørende under definitionen i stk. 2, når materialets specifikke overfladeområde volumenmæssigt er større end 60 m^2/cm^3. Et materiale, der baseret på den antalsmæssige størrelsesfordeling er et nanomateriale, bør dog betragtes som værende i overensstemmelse med definitionen i stk. 2, selv hvis materialet har et specifikt overfladeområde på under 60 m^2/cm^3.

»partikel«: et meget lille stykke stof med veldefinerede fysiske grænser

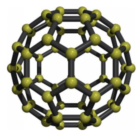
»agglomerat«: en samling løst bundne partikler eller aggregater, hvor det resulterende eksterne overfladeområde svarer til summen af de enkelte komponenters overfladeområde

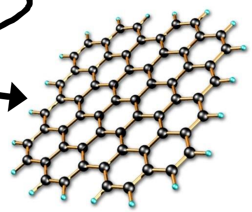
»aggregat«: en partikel, der består af tætbundne eller sammensmeltede (primær)partikler.

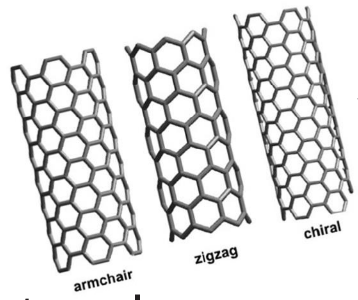
FORSKNINGSCENTER FOR ARBEJDSMILJØ

Europakommissionens forslag til regulatorisk definition af et nanomateriale

Et partikulært materiale er et nanomateriale hvis 50% af partiklerne har mindst én ydre diameter mellem 1 og 100 nm. Uanset dimensioner, så skal fullerener, grafen og enkelt-væggede kulstofnanorør altid betragtes som et nanomateriale.







Et nanomateriale kan evt. identificeres udfra dets volumen-specifikke overfladeareal, hvor det er et nanomateriale, hvis materialets volumen-specifikke overfladeareral er 60 cm^2/cm^3 og derover. Hvis det volumenspecifikke overfladeareal er mindre end 60 cm^2/cm^3, så kan materialet stadig være et nanomateriale iht. antals-størrelses-fordelingen

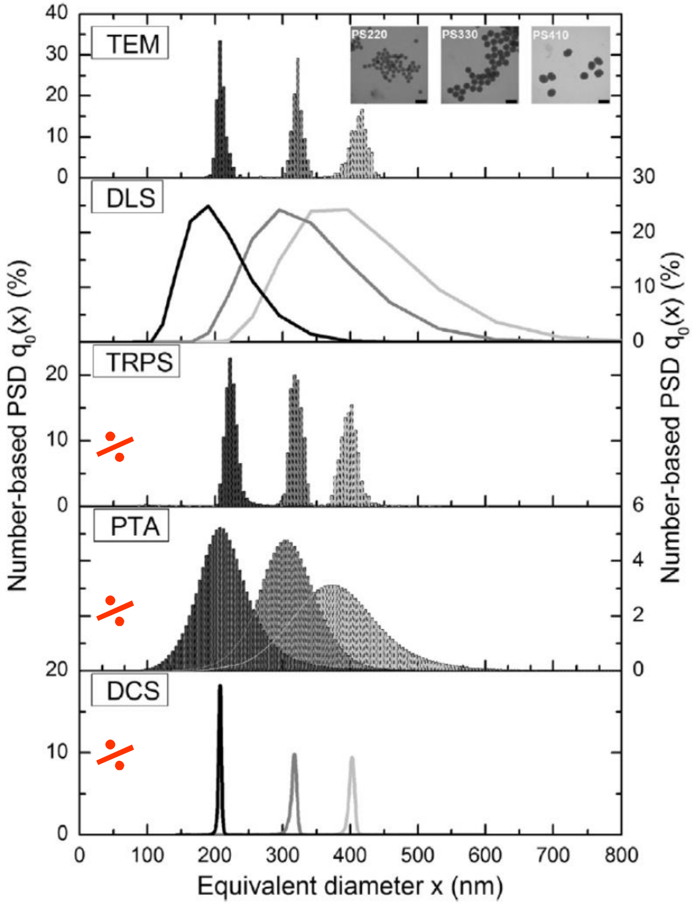
$$VSSA = [m^2/g] / [g/cm^3]$$

FORSKNINGSCENTER FOR ARBEJDSMILJØ

Status på SOPêr til ID af nanomaterialer baseret på antals-størrelsesfordelingen.

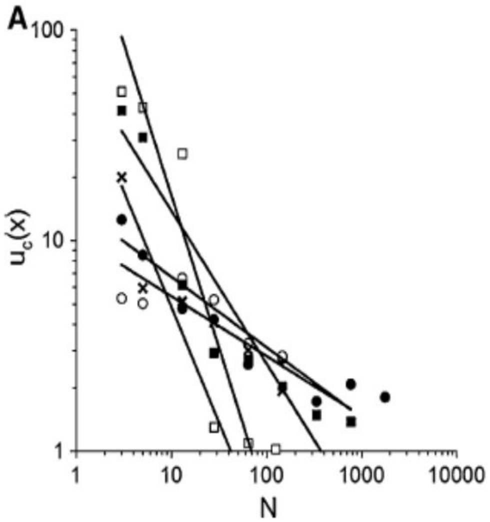
Å **Måling af diametre (metode-afhængig)**

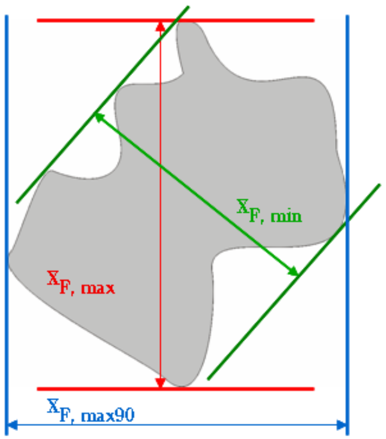
- Å Dynamisk lysspredning (DLS)
- Å Nanoparticle Tracking Analyzer (NTA)
- Å Assymmetrisk Field-Flow Fractionation (AFFF)
- Å Single-Particle ICP-MS (SP-ICP-MS)
- Å Electrospray Scanning Mobility Particle sizing (E-SMPS)
- Å Disc centrifuge (DS)
- Å Differential centrifugal sedimentation (DCS)
- Å Tunable Resistive Pulse Sensor (TRPS)
- Å Scanning Electron Mikroskopi (SEM)
- Å Transmissions Electron Mikroskopi (TEM)
- Å Atomic Force Mikroskopi (AFM)



Anderson et al. JCIS (2013)

Status på SOP til ID af nanomaterialer baseret på antals-størrelsesfordelingen.





https://www.sympatec.com

Table 2 Relative standard and expanded measurement uncertainties (%) of the mean ECD obtained by TEM for RM-8012, RM-8013, P1, and H1

TEM ECD (nm)	RM-8011	RM-8012	RM-8013	P1	H1	Average[a]
Mean measured value C_m	9.3 nm	27.4 nm	58.5 nm	99.7 nm	203.1 nm	
Reference value C_{ref}	8.9 nm	27.6 nm	56.0 nm	102.0 nm[b]	202.0 nm[b]	
Repeatability uncertainty $u(r)$	2.62 %	1.68 %	1.28 %	0.96 %	0.76 %	1.46 %
Intermediate precision uncertainty $u(ip)$	2.02 %	0.39 %[c]	1.76 %	1.02 %	0.18 %[c]	1.07 %
Measurement uncertainty $u(m)$	1.13 %	0.47 %	0.85 %	0.52 %	0.21 %	0.61 %
Calibration uncertainty $u(cal)$	0.01 %	0.97 %	0.97 %	0.97 %	0.97 %	0.78 %
Combined uncertainty $u_c(x)$	3.49 %	2.03 %	2.53 %	1.78 %	1.26 %	2.06 %
Expanded uncertainty $U(x)$	6.99 %	4.06 %	5.05 %	3.56 %	2.53 %	4.12 %
Δm	0.4 nm	0.2 nm	2.5 nm	2.3 nm	1.1 nm	
$U(x) - \Delta m$	0.2 nm	0.9 nm	0.5 nm	1.2 nm	4.0 nm	

[a] Average $u(r)$, $u(ip)$, and $u(cal)$ from RM-8011, RM-8012, RM-8013, P1, and H1, with calculated $u(m)$, $u_c(x)$, and $U(x)$

[b] Reference modal hydrodynamic diameter by PTA

[c] $MS_{between} < MS_{within}$

De Temmerman et al. JNR (2014)

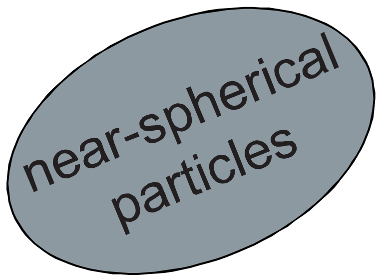
Traditionelt fx.:

Minimum Feret Diameter: $x_{F,min}$

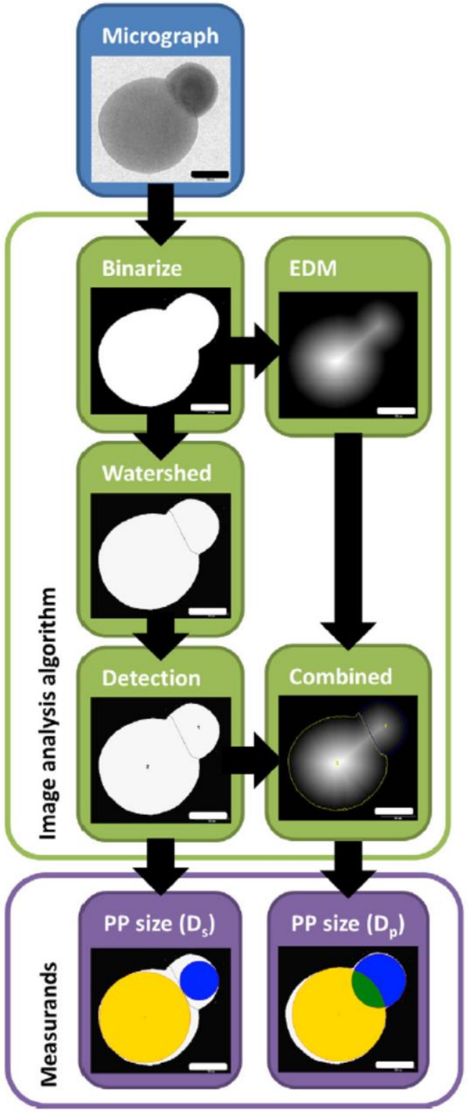
Maximum Feret Diameter: $x_{F,max}$,

Mean Feret Diameter: $x_{F,mean}$

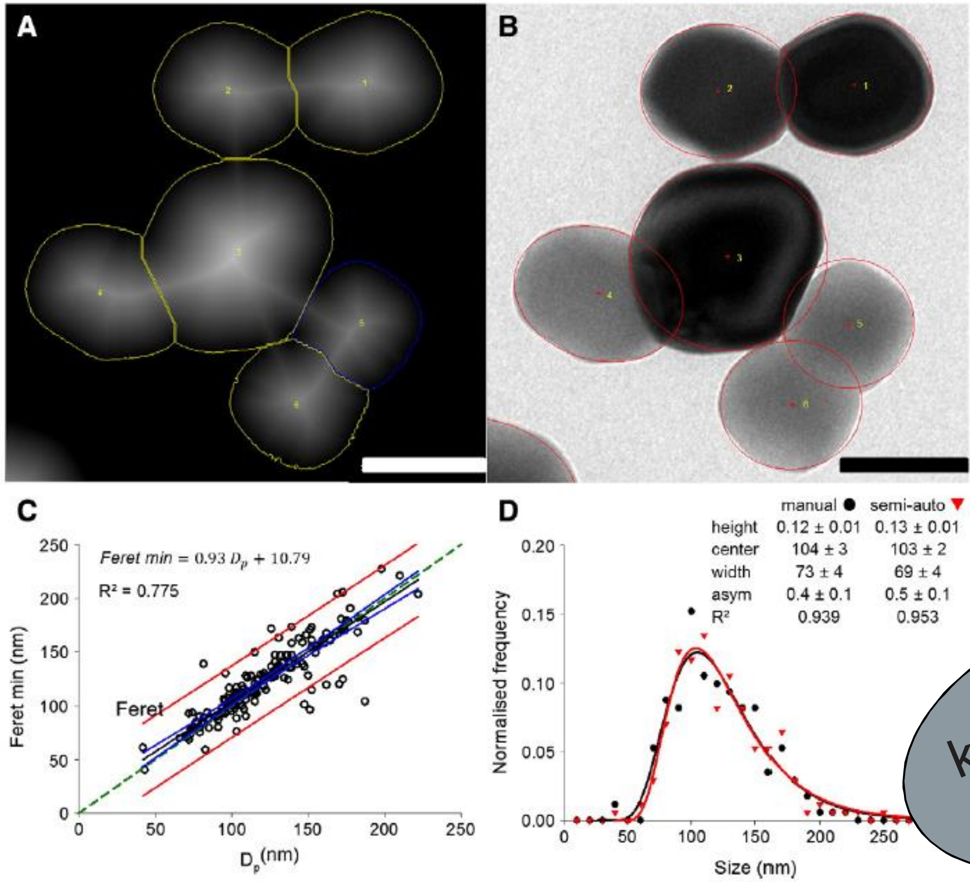
Equivalent Circular Diameter: ECD



Status på SOP til ID af nanomaterialer baseret på antals-størrelsesfordelingen.



Semi-automatisk bestemmelse af minimumsdiameteren af nano-objekter som singlets og i aggregater og agglomerater (Water-shed segmentation, Euclidian gray-scale distance-to-background mapping to define centers and draw the maximal diameter inner circle.



De Temmerman et al Powder Techn (2014)

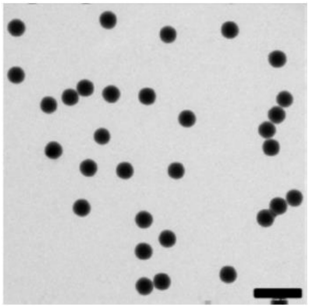
komplekse aggregater

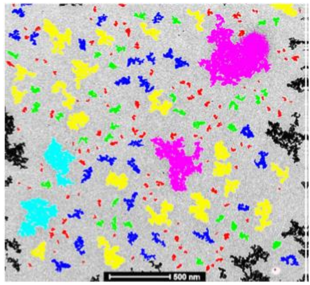
Status på den semi-automatiske TEM methode

Verificeret

ÅColloidal
- Å Gold NIST RM
- Å SAS silica CRM
- Å Ag (NM-30x)
- Å Au (NM-33x)

ÅPulver
- Å TiO_2 (NM-10x)
- Å ZnO (NM-11x)
- Å SAS (NM-20x)
- Å CeO (NM-21x)





Igangværende

ÅNANoREG
- Å Kolloider
- Å Blandinger og « nanorods »
- Å Aggregater og komplekse NM

ÅNanoDefine (samarbejde)
- Å $CaCO_3$
- Å Pigment yellow
- Å $BaSO_4$
- Å Difficulties expected for
  - Å Nanoplates like nanosteel
  - Å Kaolin

Arbejdstimer til analysen:
Semi-automatisk: ca. 120 minutter
Automatisk: ca. 40 minutter

Data: > 20 str. parametre og VSSA

ÅOptag TEM billeder
ÅGem billeder i database
ÅAnalyser billeder
ÅProcesser data
ÅRapporter
- Å Deskriptiv statistik
- Å Antalsbaseret partikel-størrelses-fordelinger

Kilde: De Temmerman, E Verleisen, J Mast (CODA CERVA)

Status på SOP til bestemmelse af det volumen-specifikke overflade-areal

- Å Metode baseret på BET nitrog... ...rgon gas-adsorptionsmetoden og foreslået af SCENIHR (2010) o... ...l. Nano Today (2010)
- Å Videreudvikling i EU FP7 pr... ...og NANoREG SOP udvikling
  - Å Skeletal densitet bestemmes...
  - Å VSSA varier med morfologi... ...uceres vha. Basal morfologisk evaluering af... ...SEM (scanning elektron mikroskopi)
    - Å Partikel (aspekt...
    - Å Nanorod (aspe...
    - Å Nanorod (asp...
  - Å Metode (t-plot) til a... ...og nanoporøsitet anvendes for at minimere antalle... ...vikling.
  - Å Test har vist at... ...-substans nanomaterialer (ingen coating eller funkti...
  - Å Europakommisionens a... ...revideres

EU 7th FRAMEWORK PROGRAMME

NMP.2013.1.4-3: Development of methods and standards supporting the implementation of the Commission recommendation for a definition of nanomaterial

NanoDefine

Development of an integrated approach based on validated and standardized methods to support the implementation of the EC recommendation for a definition of nanomaterial

FP7-NMP-2013-LARGE-7

Deliverable title:

Evaluation report on the applicability ranges of the volume specific surface area (VSSA) method and the quantitative relation to number based particle size distribution for real-world samples

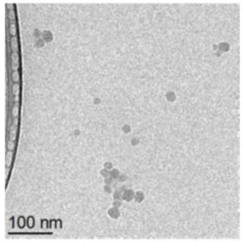
Deliverable number: 3.5
Work Package number: 3
Lead beneficiary: BAM

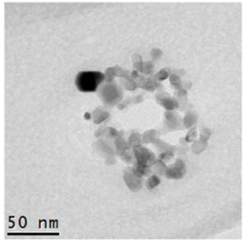
Delivery date (project month): 18
Actual delivery date (project month): 18

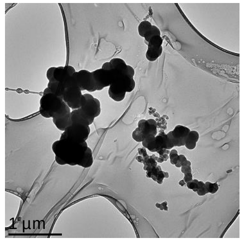
The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under Grant Agreement n° 604347

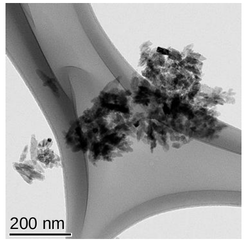
A common European approach to the regulatory ... f nanomaterials

Konklusioner









ÅDen seneste teknisk-videnskabeling udvikling er på vej til at muliggøre anvendelsen af Europakommissionens forslag til regulatorisk definition af et nanomateriale:

Å En metode til bestemme størrelsesfordelingen vha. transmissions-elektron mikroskopi er under validering (andre alternative metoder er også i spil og specielt til screenings formål

Å En protocol til screenings-identifikation af nanomaterialer baseret på VSSA er undervejs. Resultaterne antyder at europakommisionens definition bør opdateres ift. anvendelse af VSSA, idet partikelform (morfologi) og især længde-diameter forhold påvirker tærskelværdien hvorved nanomaterialet forekommer meget.

ÅMange andre metoder, herunder, OECDs tekniske guidelines er under evaluering. De fleste skal revideres for at blive anvendelige til måling af nanomaterialer!

ÅNye metoder forventes at omfatte metoder til bestemmelse af nanomaterialers biologiske interaktion, opløselighed og transformation I biologiske systemer