

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

### **Nature des résidus de pesticides dans les produits transformés** **Hydrolyse à haute température**

#### **INTRODUCTION**

1. La plupart des aliments ou des produits agricoles bruts sont transformés avant d'être consommés par le grand public. En fait, la majeure partie des produits agricoles bruts peuvent être consommés sous des formes très diverses: pommes de terre cuites à l'eau, pommes de terre frites, chips, etc. Les procédés (industriels ou domestiques) mis en œuvre pour obtenir ces aliments transformés sont extrêmement variés.

2. Les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées habituellement prescrites par des lignes directrices établissent la définition des résidus contenus dans des produits récoltés. Toutefois, elles ne précisent pas forcément la nature des résidus qui se trouvent à l'intérieur ou à la surface des produits transformés. Étant donné la place importante que les produits transformés occupent dans l'alimentation et le commerce, il importe de déterminer la nature des produits de transformation qu'ils sont susceptibles de contenir.

3. Les études sur la nature des résidus contenus dans les produits transformés sont des modélisations utilisées pour prédire la voie de dégradation de l'ingrédient actif. Elles permettent non seulement d'identifier les produits de dégradation des résidus contenus dans un produit agricole brut soumis à certains procédés génériques de transformation, mais également de déterminer les quantités relatives de ces produits de dégradation.

#### **OBJECTIF**

4. Lorsque des résidus sont présents dans des produits agricoles bruts qui ne sont habituellement consommés qu'après avoir été transformés par des procédés industriels ou domestiques, il peut être nécessaire de quantifier les résidus contenus dans ces aliments transformés. En fonction du type de procédé mis en œuvre et de la nature chimique des résidus contenus dans le produit agricole brut, il faut d'abord déterminer si les résidus présents dans les produits transformés pourraient être différents de ceux que l'on observe dans le produit agricole brut. Cette ligne directrice décrit la procédure à suivre pour réaliser ces études.

5. Bien que les études sur la nature des résidus soient des modélisations, celles qui sont spécifiquement axées sur des produits transformés servent plusieurs objectifs principaux:

- établir une estimation de la composition relative des résidus totaux dans les produits transformés ;
- identifier les composants majeurs du résidu final dans les produits transformés, afin de spécifier les composants qui doivent être analysés dans l'étude de quantification des résidus (c'est-à-dire

© OCDE, (2007).

L'OCDE autorise l'utilisation de ce contenu pour usage personnel, dans un but non commercial sans autorisation préalable, sous réserve de mention de la source. Toute utilisation à but commercial doit faire l'objet d'une autorisation écrite préalable de l'OCDE.

déterminer la/les définition(s) de résidus à des fins d'évaluation des risques et de contrôle du respect de la réglementation) ;

- élucider la voie de dégradation empruntée par l'ingrédient actif dans les produits transformés dans des conditions d'hydrolyse.

## **CONDUITE DES ETUDES**

### **Généralités**

6. Plusieurs opérations de transformation sont considérées comme représentatives des procédés de transformation des denrées alimentaires les plus répandus au niveau industriel et domestique. Il s'agit notamment des opérations suivantes:

- la cuisson à l'eau des légumes, des légumineuses et des céréales
- la préparation de conserves de fruits
- la préparation de jus de fruits
- la préparation d'huiles alimentaires
- la préparation de boissons alcoolisées, notamment la bière et le vin
- la préparation du pain
- la préparation de pâtes instantanées
- la friture des légumes, de la viande et du poisson
- la fermentation du lait et des légumes

On admet que les procédés physiques simples, tels que la mouture et le pressage, n'exercent aucune influence sur la nature des résidus dès lors que la température reste constante durant le processus.

7. Les procédés de transformation sont tels que la réalisation d'une étude sur des produits transformés menée à l'aide de substances chimiques marquées par des isotopes radioactifs ne permettrait pas de rendre compte des pratiques industrielles ou domestiques. De même, il serait non seulement difficile, mais également coûteux, de faire subir des transformations à des échantillons contenant des résidus radiomarqués issus d'études sur la nature du résidu dans les végétaux ou les animaux d'élevage.

8. Le paramètre ou facteur le plus susceptible d'affecter la nature du résidu dans un grand nombre d'opérations de transformation est l'hydrolyse. Des procédés comme le chauffage ont généralement pour effet de désactiver les enzymes contenues dans le substrat, de sorte que l'hydrolyse simple est le principal mécanisme de dégradation. Dans le cadre d'une opération déterminante, c'est donc l'hydrolyse – caractérisée par la température, la durée et le pH – qui influence la nature des résidus. Par exemple, la pasteurisation du jus extrait de fruits pressés est l'opération déterminante dans la préparation du jus de fruits.

9. Si l'on se base sur la solubilité dans l'eau de l'ingrédient actif (telle que donnée dans la section relative aux propriétés physico-chimiques), aucune étude de modélisation sur l'hydrolyse ne doit être réalisée pour les substances dont la solubilité dans l'eau est  $< 0.01$  mg/L. Dans le contexte de ces études, les substances dont la solubilité dans l'eau est  $\geq 0.5$  mg/L sont considérées comme fortement hydrosolubles, tandis que celles dont la solubilité est comprise entre ces deux valeurs ( $>0.01$  mais  $<0.5$  mg/L) sont considérées comme faiblement hydrosolubles.

10. Des études ne sont pas nécessairement exigées lorsque les opérations sont des manipulations simples qui n'impliquent aucun changement de température durant la transformation de la plante ou du

produit végétal – comme le lavage, la taille, le pressage ou la mouture – ou lorsque la seule activité à réaliser consiste à déterminer la répartition des résidus entre la peau et la pulpe.

11. La modélisation est considérée comme l'approche idéale pour déterminer la nature du résidu dans des fractions transformées. Par conséquent, cette ligne directrice énumère une série de conditions hydrolytiques qui peuvent être utilisées pour simuler des procédés de transformation courants.

12. Le substrat n'a vraisemblablement pas d'effet majeur sur le procédé de transformation (si ce n'est qu'il détermine parfois le pH), de sorte que cette ligne directrice n'impose pas de réaliser les essais sur le produit lui-même.

13. Pour déterminer si le résidu a été suffisamment caractérisé et identifié, il faut tenir compte de la quantité de radioactivité caractérisée ou identifiée, de la structure chimique de l'ingrédient actif et des produits de dégradation identifiés et de la toxicité de produits chimiques de structure similaire à celle des produits de dégradation potentiels. Si la structure d'un produit de dégradation est identique à celle d'un autre produit chimique pesticide homologué et si l'information est tombée dans le domaine public, le demandeur doit le notifier.

14. Ces études étant menées dans un système fermé où les pertes ne peuvent se produire que par précipitation, par adhérence à la surface des contenants et par dégradation en substances gazeuses, il faut retracer/récupérer 90 % des résidus radioactifs totaux après hydrolyse. Si ce pourcentage n'est pas atteint, une justification doit être fournie. L'objectif avoué d'une telle étude est l'identification et la caractérisation d'au moins 90 % des résidus radioactifs totaux restants. Dans des cas très rares, il reste impossible d'identifier des parties importantes des résidus radioactifs totaux, en particulier lorsque la dégradation poussée du pesticide donne de nombreux composants en faibles concentrations et/ou instables. Dans ce cas, il est important que le demandeur démontre clairement la présence des composants, qu'il en mesure les teneurs et qu'il tente, dans la mesure du possible, de les caractériser.

### **Conditions hydrolytiques**

15. Les données d'hydrolyse (qui font partie des éléments requis pour établir les propriétés physico-chimiques d'un ingrédient actif) sont normalement générées à des températures comprises entre 0°C et 40°C durant une période choisie pour permettre l'observation d'une dégradation d'au moins 70 % aux valeurs de pH 4, 7 et 9. Ces études étant principalement destinées à recueillir des informations en rapport avec des conditions environnementales, les données qu'elles génèrent ne sont pas interchangeables avec celles qui sont exigées dans le cadre des modélisations décrites ici. En tant que telles, des données physico-chimiques ne peuvent se substituer aux données obtenues dans le cadre d'études menées conformément à cette ligne directrice, dans la mesure où les opérations de transformation visées ici se déroulent habituellement à des températures plus élevées, durant des temps plus courts et, dans certains cas, à des valeurs de pH plus extrêmes. Les réactions sont donc plus rapides et peuvent engendrer des produits de dégradation différents.

16. Le tableau 1 présente une synthèse des conditions (température, temps et pH) caractéristiques de chacune des opérations de transformation visées.

Tableau 1: Paramètres caractéristiques de certaines opérations de transformation

Type de procédé	Opération déterminante	Température (°C)	Temps (min)	pH
Cuisson à l'eau des légumes, des céréales	Ébullition	100 <sup>(1)</sup>	15 - 50 <sup>(2)</sup>	4.5 - 7
Conserves de fruits	Pasteurisation	90 - 95 <sup>(3)</sup>	1 - 20 <sup>(4)</sup>	3 - 4.5
Conserves de légumes	Stérilisation	118 - 125 <sup>(5)</sup>	5 - 20 <sup>(6)</sup>	4.5 - 7
Jus de fruits	Pasteurisation	82 - 90 <sup>(7)</sup>	1 - 2 <sup>(8)</sup>	3 - 4.5
Huile	Raffinage	190 - 270 <sup>(9)</sup>	20 - 360 <sup>(10)</sup>	6 - 7
Bière	Brassage	100	60 - 120	4.1 - 4.7
Vin rouge <sup>(11)</sup>	Chauffage de la grappe foulée	60	2 <sup>(12)</sup>	2.8 - 3.8
Pain	Cuisson au four	100 - 120 <sup>(13)</sup>	20 - 40 <sup>(14)</sup>	4 - 6
Pâtes instantanées	Cuisson à la vapeur et déshydratation (par friture ou par séchage à l'air chaud)	100 140 150 (friture) >80 (air)	1-2 - 1-2(friture) 120(air)	9 <sup>(15)</sup>

- (1) Température des légumes durant la cuisson
- (2) Temps durant lequel les légumes ou les céréales sont maintenus à 100°C
- (3) Température à l'intérieur des conserves de fruits durant la pasteurisation
- (4) Temps durant lequel les conserves de fruits sont maintenues à 90 - 95°C
- (5) Température à l'intérieur des conserves de légumes durant la stérilisation
- (6) Temps durant lequel les conserves sont maintenues à 118 - 125°C
- (7) Température du jus de fruits durant la pasteurisation
- (8) Temps durant lequel les jus de fruits sont maintenus à 82 - 90°C
- (9) Température à laquelle s'effectue la désodorisation durant le raffinage
- (10) Durée de la désodorisation
- (11) Le vin blanc n'est pas chauffé
- (12) Ensuite, le vin est soit réfrigéré brusquement, soit mis à refroidir lentement (pendant une nuit)
- (13) Température à l'intérieur de la miche et en surface durant 20 - 40 minutes
- (14) Temps durant lequel l'intérieur et la surface de la miche sont respectivement maintenus à 100 et à 120 °C
- (15) La farine de blé est malaxée avec 0.1-0.6% de *Kansui* (eau alcaline contenant 20 % de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 3.3 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

17. Par essence, la plupart des opérations de transformation énumérées au paragraphe 6 correspondent à l'éventail des paramètres énumérés au tableau 1. Seules quelques opérations, comme la fermentation ou la friture, ne sont pas couvertes.

18. À partir des données du tableau 1, on peut restreindre encore davantage la liste des paramètres et définir trois séries représentatives de conditions d'hydrolyse. Celles-ci sont présentées au tableau 2. Ces données doivent être utilisées de manière appropriée pour étudier les effets de l'hydrolyse sur chacune des opérations de transformation.

Tableau 2: Conditions d'hydrolyse représentatives

Température (°C)	Temps (min)	pH	Opérations concernées
90	20	4	Pasteurisation
100	60	5	Cuisson au four, brassage, ébullition
120*	20	6	Stérilisation

\* système fermé sous pression (par exemple, autoclave ou système similaire)

19. Les conditions extrêmes qui devraient être réunies pour reproduire, d'une part, la température et la durée du processus de désodorisation effectué lors du raffinage et, d'autre part, le pH des pâtes instantanées (tableau 1) n'ont pas été incluses dans cette série de conditions représentatives. La nécessité de réaliser de telles études doit être examinée au cas par cas avec les autorités de réglementation.

20. En revanche, l'hydrolyse de composés parents durant la préparation du vin est déjà couverte par l'étude effectuée dans le cadre de la section sur les propriétés physico-chimiques (c'est-à-dire par les essais d'hydrolyse courants réalisés conformément à la ligne directrice 111 de l'OCDE), dans la mesure où ces conditions sont assez comparables aux températures moins élevées qui caractérisent le processus de vinification. Néanmoins, les modifications que le composé parent ou son métabolite prédominant pourraient subir durant le processus de fermentation ne sont pas couvertes par les conditions du modèle d'hydrolyse et cette question doit être examinée avec les autorités de réglementation.

21. Les conditions de température et de temps susceptibles d'être observées dans la préparation de la viande et du poisson ne sont pas représentées. La nécessité de réaliser de telles études doit être examinée au cas par cas avec les autorités de réglementation.

## **MÉTHODE D'ESSAI**

### **Substance d'essai**

22. En règle générale, les études d'hydrolyse qui simulent des procédés de transformation utilisent un ingrédient actif marqué par un isotope radioactif. Toutefois, les études sur la nature des résidus peuvent utiliser un ou plusieurs composant(s) représentatif(s) du résidu qui a été défini dans l'aliment (grâce aux études sur le métabolisme dans les plantes cultivées, aux études sur les cultures en rotation en milieux clos et aux études sur le métabolisme dans les animaux d'élevage). La définition d'un résidu de pesticide peut englober l'ingrédient actif auquel s'ajoutent un ou plusieurs métabolites, ou un ou plusieurs métabolites (ou produits de dégradation). Si l'ingrédient actif est le résidu majeur dans l'aliment, il suffit d'utiliser l'ingrédient actif. Lorsqu'un seul métabolite végétal est le résidu prédominant dans l'aliment, l'utilisation de ce seul métabolite peut convenir. De manière générale, l'utilisation de mélanges est déconseillée et dans ce type de situations, il est préférable de réaliser des études distinctes. Cette décision doit toutefois être prise au cas par cas. Il en va également ainsi lorsque des métabolites majeurs sont issus de plusieurs ingrédients actifs. Par exemple, une comparaison entre la structure des différents métabolites, de l'ingrédient actif et des produits d'hydrolyse pourrait montrer qu'il est inutile de réaliser des études supplémentaires.

23. Les ingrédients actifs radiomarqués permettent d'élucider la voie de dégradation possible et de quantifier le degré de dégradation. Étant donné que ces études sont menées sans matrice végétale/animale, les résidus liés n'entrent pas en ligne de compte. Néanmoins, il arrive parfois que des produits d'hydrolyse soient insolubles et qu'ils précipitent ou adhèrent aux parois du réacteur. Le marquage de l'ingrédient actif doit permettre de suivre la voie de dégradation aussi longtemps que possible. Le marqueur radioactif doit être placé dans la molécule de façon à permettre le dépistage correct de tous les radicaux ou produits de dégradation importants. Lorsque la molécule contient des structures à plusieurs cycles ou des chaînes

latérales importantes, des études séparées correspondant au marquage de chaque cycle ou de chaque chaîne latérale devront normalement être réalisées si un clivage entre ces radicaux est susceptible de se produire. Il convient de privilégier et d'utiliser les positions de marquage utilisées dans les études disponibles sur le métabolisme. Une argumentation scientifique peut remplacer les études incluant plusieurs marqueurs radioactifs lorsqu'aucun clivage n'est présumé. Les clivages de liaisons entre des cycles ou des chaînes qui peuvent être prédits, notamment à partir des données obtenues dans le cadre d'études sur le métabolisme dans les plantes cultivées ou d'études d'hydrolyse, doivent être pris en compte.

24. Il convient de s'assurer de la stabilité de la position choisie pour le marquage. L'isotope préféré est le  $^{14}\text{C}$ , mais lorsque la molécule ne contient aucun atome de carbone ou seulement des chaînes latérales portant des atomes de carbone labiles, le  $^{32}\text{P}$ , le  $^{35}\text{S}$  ou d'autres isotopes radioactifs sont parfois mieux adaptés. Si le choix se porte sur une chaîne latérale potentiellement labile, l'étude ne sera considérée comme valide que si toute la radioactivité significative est identifiée et qu'il est démontré qu'elle est associée à l'ingrédient actif et non au marqueur perdu par la structure de base de la molécule d'ingrédient actif.

25. L'utilisation du marqueur tritium ( $^3\text{H}$ ) n'est pas autorisée, car des échanges d'atomes d'hydrogène avec l'eau sont toujours possibles.

26. L'activité spécifique de l'ingrédient actif radiomarqué doit se conformer aux exigences en matière de données imposées dans l'étude sur la nature des résidus (quantification d'environ 0.01 mg/kg de résidus radioactifs totaux). Une pureté radiochimique inférieure à 95 % au moment de l'application devra être justifiée.

27. Il est conseillé d'utiliser des isotopes stables tels que le  $^{13}\text{C}$ , le  $^{15}\text{N}$  ou le deutérium  $^2\text{D}$  (non échangeable) en combinaison avec l'isotope radioactif pour faciliter l'identification des produits de dégradation par plusieurs méthodes spectroscopiques [spectrométrie de masse (SM) ou résonance magnétique nucléaire (RMN)].

### **Conditions expérimentales**

28. Les trois conditions hydrolytiques représentatives doivent être étudiées, quelle que soit la gamme des utilisations possibles du produit phytosanitaire concerné.

29. Dans ces modélisations, l'ingrédient actif doit être dissous dans un tampon stérilisé. Le pH de la solution d'essai doit être vérifié à l'aide d'un pH-mètre étalonné au début et à la fin de l'expérimentation avec une précision d'au moins  $\pm 0.1$ . Les solutions tampons peuvent être préparées conformément aux tableaux figurant dans la ligne directrice n° 111 de l'OCDE [voir paragraphe 48 c)].

30. Dans les études à réaliser ici, la valeur proposée pour la concentration d'un ingrédient actif soluble dans l'eau est de 1.0 mg/L. Tout écart par rapport à cette valeur proposée doit être justifié. L'utilisation de solvants miscibles n'est recommandée que pour les substances faiblement solubles dans l'eau (en l'occurrence, celles dont la solubilité dans l'eau est  $>0.01$  mais  $<0.5$  mg/L). La quantité de solvant ne doit pas excéder 1 pourcent et le solvant ne doit pas interférer avec le processus hydrolytique. Dans certaines circonstances, deux concentrations peuvent toutefois être utilisées pour faciliter l'identification.

31. Pendant le déroulement de l'étude, il importe de maintenir la solution d'essai à chacune des températures requises  $\pm 5^\circ\text{C}$ . Lorsqu'il est fait usage d'un autoclave ou de tout autre instrument similaire, des écarts plus importants peuvent être acceptés. En règle générale, la lumière naturelle n'influence pas le processus de transformation, surtout dans les procédés et environnements industriels. Lorsque les

ingrédients actifs sont photolabiles, on optera pour des méthodes permettant d'éviter les effets de photolyse.

### Analyse

32. Durant la première phase de l'étude d'hydrolyse, on analyse la radioactivité d'une fraction aliquote pour déterminer les résidus radioactifs totaux par comptage à scintillation liquide et pour s'assurer qu'aucune perte significative ne se produit au cours de l'étude, notamment par adhérence aux contenants. Toutes les mesures nécessaires doivent être prises pour solubiliser les résidus solides.

33. Les échantillons peuvent être analysés directement par chromatographie ou être extraits par une série de solvants ou de mélanges de solvants dont les polarités et autres caractéristiques dépendent de la nature des résidus attendus. Les extraits obtenus sont qualifiés de « résidus extractibles », analogues à ceux obtenus dans le cadre des études sur le métabolisme. Une part importante du marqueur radioactif devrait être extractible, mais des résidus insolubles peuvent quelquefois se former. On accordera une attention particulière aux résidus qui adhèrent aux réactifs utilisés. Toutes les mesures nécessaires doivent être prises pour dissoudre les résidus solides. La caractérisation et l'identification des résidus extractibles sont résumées au tableau 3.

34. L'identification consiste à déterminer exactement la structure des composants des résidus radioactifs totaux. La caractérisation consiste à élucider la nature générale et les caractéristiques du résidu radioactif. Pour caractériser les résidus, les termes suivants sont employés: organosoluble, soluble dans l'eau ou dans une solution aqueuse, neutre, acide ou alcalin, polaire, non polaire, etc. La caractérisation peut également faire intervenir des descriptions de radicaux chimiques dont la présence dans la molécule est avérée par leur conversion en une structure courante ou par leur réactivité avec des réactifs particuliers. Le degré de caractérisation atteste de la précision avec laquelle on s'approche de l'identification structurale complète.

35. En cas d'échec de l'identification des résidus radioactifs, le degré de caractérisation nécessaire pour une partie de la radioactivité totale dépend de plusieurs facteurs, notamment la quantité du résidu présent, la quantité des résidus radioactifs totaux déjà identifiés, des préoccupations d'ordre toxicologique liées à une classe de composés et/ou de produits de dégradation, l'importance escomptée du résidu évaluée par la caractérisation déjà réalisée et l'aptitude des procédés analytiques à détecter des résidus caractérisés mais non identifiés (par conversion en un radical courant). La conversion en un radical courant est acceptable pour caractériser de nombreux composants présents à faible concentration. Toutefois, cette approche ne peut être adoptée pour s'affranchir de l'identification d'une part significative des résidus.

36. Habituellement, l'identification est réalisée en soumettant simultanément à une chromatographie le produit de dégradation et des étalons connus, en utilisant deux systèmes différents, ou grâce à des techniques à même de fournir une identification structurale positive, par exemple la spectrométrie de masse (SM) ou la résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans le cas d'une co-chromatographie, il faut éviter d'utiliser des techniques chromatographiques employant la même phase stationnaire avec deux systèmes de solvants différents pour vérifier l'identité du produit de dégradation, car alors les méthodes ne sont pas indépendantes. L'identification par co-chromatographie doit faire usage de deux systèmes dissemblables, analytiquement indépendants, par exemple une chromatographie sur couche mince (CCM) à phase inversée et une CCM à phase normale ou une CCM et une chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Dès lors que la qualité de la séparation chromatographique est acceptable, aucune confirmation supplémentaire par spectroscopie n'est requise. Les méthodes qui apportent des informations structurales, telles que la chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (CG-SM), la chromatographie liquide/spectrométrie de masse (CL-SM) ou la chromatographie liquide spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM), ainsi que la RMN peuvent également fournir une identification non ambiguë. Un produit de

dégradation dont on a déterminé qu'il était d'importance minimale en raison de sa faible teneur absolue peut être identifié par co-élution avec des produits de dégradation synthétiques putatifs jouant le rôle d'étalons de référence en n'utilisant qu'une seule technique chromatographique, par exemple une CLHP en phase inversée. Ceci n'a qu'une finalité largement indicative et ne s'applique pas forcément dans des cas où un produit de dégradation soulève des inquiétudes au plan toxicologique.

**Tableau 3. Stratégie d'identification et de caractérisation des résidus extractibles**

Quantité relative (% des résidus radioactifs totaux)	Concentration (mg/L)	Action requise
<b>Substances fortement solubles dans l'eau (&gt; 0.5 mg/L)</b>		
< 10	< 0.01	Pas d'action en l'absence d'inquiétudes au plan toxicologique.
< 10	0.01 – 0.05	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
< 10	> 0.05	La caractérisation/identification doit être décidée au cas par cas en tenant compte de la quantité identifiée.
≥ 10	-	Identifier en utilisant tous les moyens possibles.
<b>Substances faiblement solubles dans l'eau (0.01- 0.5 mg/L)</b>		
< 10	< 0.01	Pas d'action en l'absence d'inquiétudes au plan toxicologique.
< 10	0.01 – 0.05	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
< 10	> 0.05	Des efforts significatifs doivent être consacrés à l'identification, en particulier s'il est nécessaire d'établir une voie, une caractérisation finale peut être acceptée.
≥ 10	< 0.01	Caractériser. Ne tenter de confirmer l'identité que s'il existe des moyens directs, par exemple si un composé de référence est disponible, ou si l'identification a été réalisée dans une étude précédente.
≥ 10	0.01 – 0.05	Des efforts significatifs doivent être consacrés à l'identification, en particulier s'il est nécessaire d'établir une voie, une caractérisation finale peut être acceptée.
≥ 10	> 0.05	Identifier en utilisant tous les moyens possibles.

37. Il n'est généralement pas nécessaire de déterminer la stéréochimie des produits de dégradation. Lorsque des produits de dégradation identifiés comprenant des centres stéréochimiques doivent être inclus dans la définition des résidus et sont préoccupants au plan toxicologique, il est parfois nécessaire de calculer le rapport des stéréoisomères dans les études sur l'importance des résidus.

38. Il convient parfois d'utiliser de nouvelles techniques d'extraction et d'analyse au lieu des techniques mentionnées ci-dessus. Le cas échéant, il convient d'utiliser les technologies les plus récentes pour élucider totalement la voie de dégradation.

### **Caractérisation et identification des résidus extractibles**

39. La stratégie d'identification et de caractérisation des produits de dégradation appliquée dans les études sur la nature des résidus, décrite au tableau 3, est similaire à celle utilisée dans les études sur le métabolisme dans les plantes cultivées. Les valeurs seuils de radioactivité présentées dans le tableau 3 correspondent à la caractérisation ou à l'identification requise après application du composé d'essai radiomarqué. Cette stratégie tient compte de l'éventail des différentes solubilités dans l'eau possibles des ingrédients actifs étudiés. Pour une quantité inférieure ou égale à 0.01 mg/L de résidus radioactifs totaux dans une fraction de solvant, aucune différenciation de radioactivité n'est nécessaire, sous réserve que les résidus ne soulèvent pas d'inquiétude au plan toxicologique à des concentrations plus basses.

40. Si la concentration combinée des nouveaux métabolites ou produits de dégradation est >0.01 mg/L, il convient de se reporter au tableau 3, qui donne les valeurs seuils relatives à l'identification/la caractérisation des résidus extractibles dans le solvant concerné, sauf dans les cas où les résidus potentiels soulèvent des inquiétudes d'ordre toxicologique à des concentrations plus faibles, y compris dans les fractions polaires. Toutefois, il n'est pas toujours nécessaire d'identifier les résidus individuels présents à faible teneur, que ce soit en mg/L ou en pourcentage des résidus totaux, si les composants majeurs du résidu ont été identifiés.

41. Il convient de noter que les valeurs seuils (en termes de concentration) ne constituent pas des normes incontournables, mais de simples indicateurs du degré adéquat de caractérisation. Les efforts à fournir pour caractériser la radioactivité varient en fonction de la solubilité dans l'eau du ou des composants. En d'autres termes, les composants faiblement solubles dans l'eau nécessiteront davantage d'efforts que les composants fortement solubles dans l'eau. Dans de nombreux cas, un produit de dégradation potentiellement important peut néanmoins se répartir dans de nombreuses fractions en raison de ses caractéristiques de solubilité. L'application des valeurs seuils exigera donc, en particulier dans les cas où les résidus radioactifs totaux sont répartis dans de nombreuses fractions, de démontrer par CLHP de chaque fraction que la concentration combinée (la somme des concentrations) d'un composé individuel distribué dans les diverses fractions ne dépasse pas significativement la valeur seuil.

### **Stabilité durant l'entreposage**

42. Idéalement, la température d'entreposage idéale des échantillons doit être inférieure ou égale à -18°C. Toute autre condition d'entreposage doit être signalée et justifiée.

43. Il convient de vérifier si l'intégrité de l'échantillon a été maintenue pendant son prélèvement, sa préparation et son entreposage. Ces analyses doivent démontrer que le profil de base des résidus radiomarqués ne s'est pas modifié pendant toute la durée de l'étude. Il est impossible d'enrichir les échantillons avant de connaître l'identité du résidu et la durée nécessaire à la mise en œuvre des études d'hydrolyse. Des données relatives à la stabilité durant l'entreposage ne sont habituellement pas exigées pour des échantillons analysés dans les six mois suivant leur prélèvement, sous réserve de prouver que des

mesures ont été prises pour limiter la dégradation des résidus par un entreposage approprié des échantillons et des extraits tout au long de la phase analytique de l'étude.

44. Si des informations obtenues dans le cadre d'études sur le métabolisme dans les plantes végétales ou d'autres données font état d'une instabilité suspectée ou observée de l'ingrédient actif, des mesures devront être prises pour préserver l'intégrité de l'étude. Dans les cas où une étude sur la nature des résidus dans les produits transformés ne peut être achevée dans les six mois suivant la collecte des échantillons, il faudra démontrer que l'identité des résidus n'a pas évolué durant la période comprise entre la collecte et l'analyse finale, par exemple par l'examen d'échantillons représentatifs au début et à la fin de l'étude. Ces analyses doivent démontrer que le profil de base des résidus radiomarqués ne s'est pas modifié pendant toute la durée de l'étude.

45. La mise en évidence de modifications (par exemple, disparition d'un pic de CLHP ou d'une tache de CCM) nécessitera de procéder à de nouvelles analyses ou de mener une nouvelle étude sur la nature des résidus dans les produits transformés dans laquelle le délai séparant le prélèvement de l'analyse sera réduit.

## **RAPPORT DES RÉSULTATS**

### **Considérations relatives au rapport des résultats**

46. Les éléments suivants doivent être pris en compte lors de la conception et de la conduite de l'étude, ainsi que lors de la rédaction du rapport d'étude.

#### **Résumé/Introduction**

- a. Stratégies d'essai utilisées et justification du choix de ces conditions hydrolytiques.
- b. Protocole expérimental général employé et notamment discussion, le cas échéant, des difficultés inhabituelles d'ordre expérimental rencontrées au cours des opérations, des tentatives effectuées pour résoudre ces problèmes qui ont conduit à s'écarter du protocole d'essai prévu et des effets que ces écarts ont pu avoir sur les résultats de l'étude.
- c. Voies de dégradation observées, et notamment description complète de l'identité et de la quantité de tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux. Ces dernières informations seront de préférence résumées sous forme d'un texte assorti de tableaux et/ou de figures.
- d. Conclusion à propos de la nature qualitative des résidus radioactifs totaux.

#### **Matériels et Méthodes**

##### **e. Substance d'essai**

- (i) Identification de l'ingrédient actif du pesticide d'essai, notamment nom chimique, nom commun [American National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI) ou International Standards Organization (ISO)], nom ou numéro utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise, numéro CAS et nom chimique IUPAC.
- (ii) La ou les structures chimiques de l'ingrédient actif et des produits de dégradation qui constituent les résidus doivent être fournies et un renvoi à tous les noms utilisés pour le

développement ou l'expérimentation doit être opéré dans un document de synthèse ou une annexe de l'étude. S'ils sont disponibles, les certificats d'analyse décrivant la pureté et l'identité des étalons utilisés dans le processus d'identification seront également joints.

- (iii) Indication de la pureté, de la nature et de la source du marqueur radioactif employé dans le matériau d'essai radiomarké, ainsi que de l'activité spécifique de la substance d'essai en MBq/mg. L'identité des impuretés radiomarkées présentes en quantités significatives (>5%), dérivées de la substance d'essai, doivent également être indiquées, le cas échéant, ainsi que le(s) site(s) de marquage dans la molécule de substance d'essai radiomarkée. Le choix de radiomarqueurs autres que le  $^{14}\text{C}$  et du/des site(s) de marquage dans la molécule doivent être justifiés (dans la mesure du possible, la position de marquage sur le cycle sera minutieusement détaillée).
- (iv) L'activité spécifique de la substance d'essai doit être notée en MBq/mg, avec un exemple de calcul expliquant comment l'analyste obtient les concentrations de radioactivité (mg/kg) à partir des données expérimentales. Les informations fournies dans ce contexte doivent permettre aux autorités réglementaires compétentes de vérifier la concentration exprimée en mg/L de substance active dans les diverses fractions chromatographiques.
- (v) Toute information complémentaire que le demandeur juge utile et pertinente pour parachever une description complète et détaillée du produit chimique d'essai, par exemple ses propriétés physico-chimiques (solubilité, etc.).

**f. Installations utilisées dans l'essai**

Description de l'environnement d'essai général utilisé dans l'étude et, le cas échéant, des conditions environnementales subies dans l'installation pendant le déroulement de l'étude.

**g. Conditions hydrolytiques**

- (i) Justification ou déclaration établie par le demandeur expliquant le choix d'une condition hydrolytique différente des propositions contenues dans cette ligne directrice.
- (ii) Description du protocole de prélèvement des échantillons ou justification de l'analyse directe d'un échantillon.

**h. Application du pesticide**

- (i) Concentrations réelles utilisées dans l'étude et, le cas échéant, nature et quantité du solvant utilisé.
- (ii) Explication ou justification de toute divergence significative en termes de concentration.

**i. Manipulation des échantillons et stabilité de l'entreposage**

- (i) Description de la manipulation des échantillons.
- (ii) Description des conditions et de la durée d'entreposage des échantillons récoltés.
- (iii) Description des conditions et de la durée d'entreposage des extraits avant l'identification des résidus.

**j. Méthodes analytiques utilisées pour les analyses des résidus radioactifs**

- (i) Description des méthodes analytiques utilisées dans l'étude sur la nature des résidus pour déterminer les composants des résidus.
- (ii) Méthode de quantification de la radioactivité totale récupérée, présentée sous forme de texte, de tableau ou de figure.
- (iii) Description de la préparation des échantillons avant les analyses par scintillation liquide, le cas échéant.
- (iv) Retraçage quantitatif de la part de radioactivité totale récupérée à partir du récipient expérimental au début et à la fin de l'étude. Les pertes significatives doivent être commentées.
- (v) Informations détaillées sur les paramètres des méthodes analytiques, notamment description de l'équipement utilisé pour déterminer la radioactivité totale dans chaque échantillon. Si une correction de l'extinction (automatique ou non) est utilisée dans les méthodes de dosage de radioactivité, il convient de décrire la méthodologie employée et, le cas échéant, les méthodes appliquées pour réduire l'extinction.
- (vi) Données détaillées sur le comptage radioactif de certains échantillons représentatifs, incluant les concentrations calculées (équivalents de l'ingrédient actif en mg/L) et la limite de détection.

**k. Extraction et fractionnement de la radioactivité**

- (i) Description complète, assortie d'un schéma de procédé ou d'un diagramme dépeignant les stratégies générales d'extraction et de fractionnement employées dans l'étude d'hydrolyse.
- (ii) Discussion et justification de la séquence d'extraction et du choix du solvant d'extraction (polaire ou non) utilisé.
- (iii) Calcul et notification des efficacités d'extraction des produits chimiques radioactifs.
- (iv) Indication de l'efficacité de séparation et de purification, sur un échantillon représentatif, de toutes les techniques de fractionnement et d'isolement employées dans l'étude (séparation dans des solvants, échange d'ions, chromatographie sur colonne d'exclusion, CLHP sur gradient d'élution, autoradiographie sur couche mince bidimensionnelle dans des systèmes à plusieurs solvants).
- (v) Présentation des données permettant la mesure ou le suivi de la radioactivité perdue à chaque étape successive du protocole de fractionnement et d'isolement et discussion des démarches entreprises pour limiter au maximum ces pertes.
- (vi) Quantification et notification de la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon en termes de radioactivité totale (MBq), ainsi qu'en mg/L (équivalents de l'ingrédient actif) de la radioactivité totale recouvrée dans la matrice de l'échantillon originel analysée.

**I. Caractérisation et identification de la radioactivité**

- (i) Liste complète et description sous forme de tableau de tous les métabolites et produits de dégradation connus de l'ingrédient actif (composés modèles, notamment structure et pureté) employés pour faciliter la caractérisation et/ou l'identification des produits de dégradation non identifiés dans l'échantillon.
- (ii) Calculs et résultats des valeurs de Rf des échantillons et des références sur les autoradiogrammes de CCM et temps de rétention relatifs sur les colonnes de CG et de CLHP. Les écarts ou les variances anormaux relevés par rapport aux valeurs attendues, y compris une diminution de la résolution des échantillons entre les différents analytes (échantillons) dans des analyses chromatographiques successives, doivent être signalés et les mesures prises pour résoudre ce type de problèmes doivent être discutées.
- (iii) Présentation des photographies (ou de la détection par imagerie radioanalytique) des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM), des autoradiogrammes, ou des résultats obtenus par d'autres systèmes d'imagerie appropriés qui ont été déterminants pour l'identification. Les échantillons ou les reproductions de chromatogrammes de CLHP/CG, en particulier les analyses de spectre de masse, doivent également être soumis. Quelle que soit la technique chromatographique utilisée, il faut inclure dans le rapport les chromatogrammes illustrant le comportement des étalons analytiques.
- (iv) Descriptif détaillé de tous les protocoles analytiques de confirmation additionnels appliqués à la séparation et à la caractérisation/l'identification des produits de dégradation (échange d'ions, chromatographie d'exclusion, dérivation, etc.), ainsi que des méthodes de détermination [spectrométrie de masse à ionisation électronique (EI) et spectrométrie de masse à ionisation chimique (CI)] appliquées à l'identification finale des produits de dégradation.
- (v) Description complète de tous les instruments, de tout le matériel et de tous les réactifs utilisés, et notamment des conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- (vi) Justification de toute perte de radioactivité dans chaque fraction. La quantité signalée doit être exprimée en mg/L (en équivalents de l'ingrédient actif) de la radioactivité totale récupérée dans la fraction particulière analysée.
- (vii) Indication de tous les produits de dégradation/composants majeurs et, si possible, informations sur la nature chimique de produits de dégradation/composants discrets (mineurs).
- (viii) Toute information complémentaire que le demandeur juge utile et pertinente pour parachever une description complète et détaillée de la conduite de l'étude d'hydrolyse et de la détermination des résidus radioactifs totaux.

**Résultats et discussion****m. Stratégies d'essai**

Discussion des écarts enregistrés par rapport aux protocoles ou aux stratégies d'essai prévus, attribuables à des difficultés inhabituelles d'ordre expérimental (par exemple, des

problèmes d'extraction, de fractionnement ou de caractérisation des résidus). Une discussion sur l'impact ou les effets éventuels de ces écarts sur les résultats de l'étude doit également être proposée.

**n. Dégradation hydrolytique**

Discussion, de préférence assortie d'un diagramme, des voies de dégradation observées. Dans ce contexte, les voies métaboliques observées doivent être comparées et différenciées des voies métaboliques connues et déjà décrites dans des études sur le métabolisme dans les plantes cultivées ou relevées dans des études sur le métabolisme animal portant sur le composé chimique concerné. La voie de dégradation doit être proposée en se fondant sur les résultats des études de caractérisation et/ou d'identification et doit être accompagnée d'un tableau indiquant les structures et les noms chimiques associés (CAS et IUPAC lorsqu'ils existent). Tous les intermédiaires supposés (mais non identifiés) doivent également être clairement indiqués dans la voie.

**o. Caractérisation et/ou identification et distribution des résidus radioactifs totaux**

- (i) Utiliser des tableaux ou des graphiques. Identifier tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux, notamment par leur nom, leur structure et leur quantité [exprimée à la fois en mg/L (en équivalents de l'ingrédient actif) et en pourcentage des résidus radioactifs totaux].
- (ii) Le demandeur doit fournir un maximum d'informations sur tous les composants importants non identifiés et/ou non caractérisés du résidu terminal et sur leurs quantités.
- (iii) Traitement(s) statistique(s). Inclure des exemples représentatifs de tous les tests statistiques appliqués aux données brutes obtenues sur les échantillons et par les analyses au cours de l'étude d'hydrolyse. Fournir la limite de quantification (LQ) de la détermination de radioactivité et des séparations chromatographiques.
- (iv) Toute information complémentaire que le demandeur juge utile et pertinente pour parachever une description complète et détaillée de l'étude d'hydrolyse, en particulier les mesures de contrôle de la qualité et les précautions prises pour garantir la validité de tous les aspects de l'étude.

**p. Conclusion**

- (i) Inclure les voies de dégradation, les mécanismes impliqués et l'importance ou le degré de la dégradation observée.
- (ii) Les résultats des études de validation menées sur les échantillons radiomarqués doivent également être discutés, le cas échéant.

**q. Tableaux**

- (i) Nom, structure, pureté de tous les étalons, métabolites et produits de dégradation utilisés dans l'étude.
- (iii) Temps de rétention en CLHP/GC et valeurs de R<sub>f</sub> en CCM de l'ingrédient actif, des métabolites, des produits de dégradation, des composés apparentés et des composés

**r. Figures**

- (i) Stratégies ou schémas généraux d'extraction et de fractionnement utilisés.
- (ii) Répartition de la radioactivité dans diverses fractions de CLHP/CGL d'échange d'ions (d'exclusion) ou préparative.
- (iii) Diagrammes ou schémas des voies de dégradation.

**s. Annexes**

- (i) Exemplaies représentatifs des chromatogrammes, des spectres, etc. (le cas échéant).
- (ii) Tirés à part, cités ou fournis à titre de référence, de documents publiés ou non publiés, rapports d'entreprises, lettres, méthodes d'analyses, etc., employés par les demandeurs (sauf si ces documents figurent déjà ailleurs dans le dossier, auquel cas un renvoi suffira).
- (iii) Autres: tout renseignement pertinent qui ne relève d'aucune section du rapport.

**Rapport d'étude**

47. Le rapport d'étude doit contenir les informations suivantes :

- a. Identification de l'ingrédient actif du pesticide sur lequel porte l'essai, notamment nom chimique, nom commun [American National Standards Institute (ANSI), British Standards Institution (BSI) ou International Standards Organization (ISO)], nom utilisé pour le développement et l'expérimentation par l'entreprise, nom et numéro CAS et nom chimique IUPAC.
- b. Description de la/des substance(s) d'essai radiomarquée(s) et justification de la/des position(s) du radiomarquage, description de la pureté radioactive, nature du radiomarqueur, activité spécifique (en MBq/mg), source, identité des impuretés radiomarquées significatives, le cas échéant.
- c. Nom, structure et pureté des étalons de référence, des métabolites et des produits de dégradation utilisés dans l'étude.
- d. Description de l'environnement d'essai général utilisé dans l'étude.
- e. Description minutieuse et complète de l'extraction et du fractionnement de la radioactivité, incluant des rapports sur la quantité de radioactivité dans chaque fraction d'échantillon quantifiée en termes de radioactivité totale (MBq) et de concentration (mg/L en équivalents d'ingrédient actif) par rapport à la quantité utilisée.
- f. Description complète de tous les instruments, de tout le matériel et de tous les réactifs utilisés, et notamment des conditions de fonctionnement des instruments utilisés pour la séparation, la caractérisation et l'identification des résidus radioactifs.
- g. Caractérisation et/ou identification des résidus radioactifs incluant les données relatives à tous

les composants majeurs.

- h. Description du comportement chromatographique [par exemple, temps de rétention en CLHP et/ou en CG, valeurs de référence (Rf) en CCM] de l'ingrédient actif, des produits de dégradation et des étalons concernés. Il conviendra également d'inclure des radiochromatogrammes représentatifs des extraits d'échantillons et des chromatogrammes des étalons analytiques, ainsi que toutes les données spectrales confirmant l'identité des produits de dégradation.
- i. Informations sur la stabilité durant l'entreposage de tous les composants majeurs des résidus radioactifs totaux.
- j. Informations quantitatives sur la récupération du résidu radioactif par les procédés d'extraction utilisés.
- k. Discussion détaillée, accompagnée d'un schéma de dégradation, des voies de dégradation observées.
- l. Conclusion sur les voies de dégradation et sur le degré de dégradation observés.

## **LITTÉRATURE**

- (1) Commission des Communautés européennes, document d'orientation 7035/VI/95 rev5, Appendix E – Processing Studies, 22/7/97.  
[http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/plant/protection/resources/publications_en.htm)
- (2) Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), FAO manual on the submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed, deuxième édition, FAO, Rome, 2002.  
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRICULT/AGP/AGPP/Pesticid/Default.htm>
- (3) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, essai n° 111, hydrolyse en fonction du pH (ligne directrice mise à jour adoptée le 13 avril 2004).
- (4) US Environmental Protection Agency, Pesticide Assessment Guidelines; Fate, Transportation and Transformation, OPPTS 835.2110, Hydrolysis as a Function of pH; rapport n° 712-C-98-057, janvier 1998.  
[http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS\\_Harmonized/835\\_Fate\\_Transport\\_and\\_Transformation\\_Test\\_Guidelines/Series/](http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/835_Fate_Transport_and_Transformation_Test_Guidelines/Series/)
- (5) Directive 92/69/CEE de la Commission, du 31 juillet 1992, portant dix-septième adaptation au progrès technique de la directive 67/548/CEE du Conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses, JO L 383 du 29.12.1992, p. 113-115. Méthode C.7. JO L 383A du 29.12.1992, p. 1-235.  
[http://europa.eu.int/eur-ex/en/lif/reg/en\\_register\\_133018.html](http://europa.eu.int/eur-ex/en/lif/reg/en_register_133018.html)