



Section 1
Propriétés physico-chimiques

Essai n° 123:
Coefficient de partage (1-octanol/eau) :
méthode du brassage lent

30 juin 2022

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



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

Coefficient de partage (1-octanol/eau) : méthode du brassage lent

INTRODUCTION

1. La méthode du brassage lent a permis de déterminer avec exactitude des valeurs logarithmiques du coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{oe}) allant jusqu'à 8,2 (1). Aussi elle constitue une approche expérimentale appropriée pour la détermination directe du P_{oe} de substances fortement hydrophobes.
2. Les Lignes directrices 107 et 117 de l'OCDE (2)(3) présentent d'autres méthodes de détermination du coefficient de partage 1-octanol/eau, respectivement la méthode par agitation en flacon et la méthode par HPLC phase inverse. La méthode par agitation en flacon est sujette à des artéfacts dus au transfert de micro-gouttelettes d'octanol dans la phase aqueuse. Lorsque les valeurs du P_{oe} augmentent, la présence de ces gouttelettes dans la phase aqueuse engendre une surestimation croissante de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. Aussi l'usage de cette méthode est-il limité aux substances dont le $\log P_{oe}$ est < 4 . A partir de valeurs fiables du P_{oe} directement déterminées, la deuxième méthode étalonne la relation entre le temps de rétention sur la colonne HPLC et des valeurs mesurées du P_{oe} .
3. La présente Ligne directrice a été élaborée aux Pays-Bas. La précision des méthodes décrites dans ce document a été validée et optimisée au cours d'un essai tournant de validation auquel ont participé 15 laboratoires (4).

REMARQUES PRÉLIMINAIRES

1.1. Signification et utilisation

4. S'agissant des substances organiques inertes, une relation très significative a été mise en évidence entre leur coefficient de partage 1-octanol/eau (P_{oe}) et leur bioaccumulation dans les poissons. De plus, une corrélation entre le P_{oe} et, d'une part, la toxicité pour les poissons et, d'autre part, la sorption de produits chimiques sur des solides tels que les sols et les sédiments, a également été démontrée. La référence (5) livre un large aperçu de ces relations.

5. Des relations très diverses entre le coefficient de partage 1-octanol/eau et d'autres propriétés des substances intéressant la chimie et la toxicologie environnementales ont été établies. Le coefficient de partage 1-octanol/eau est ainsi devenu un paramètre fondamental dans l'évaluation des risques des substances chimiques pour l'environnement et dans la prédiction du devenir de ces substances dans l'environnement.

1.2. Champ d'application

6. La méthode du brassage lent est censée réduire la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol dans la phase aqueuse, ce qui écarte le problème de la surestimation de la concentration en phase aqueuse due à la présence de molécules de la substance d'essai dans ces gouttelettes. Par conséquent, la méthode du brassage lent convient particulièrement à la détermination du P_{oe} de substances dont le $\log P_{oe}$ est supposément supérieur ou égal à 5, gamme dans laquelle la méthode par agitation en flacon (2) tend à fournir des résultats faussés.

DÉFINITION ET UNITÉS

7. Le coefficient de partage d'une substance entre l'eau et un solvant lipophile (1-octanol) caractérise la répartition à l'équilibre de la substance chimique entre les deux phases. Le coefficient de partage entre l'eau et le 1-octanol (P_{oe}) est défini comme étant le rapport des concentrations à l'équilibre de la substance d'essai dans du 1-octanol saturé avec de l'eau (C_o) et dans de l'eau saturée avec du 1-octanol (C_e).

$$P_{oe} = C_o/C_e$$

Le rapport de deux concentrations est une valeur sans dimension. Il est exprimé le plus souvent par son logarithme décimal ($\log P_{oe}$). Le P_{oe} dépend de la température et les résultats rapportés doivent préciser la température de mesure.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

8. En vue de déterminer le coefficient de partage, on laisse le système formé par l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrer à température constante. Ensuite, on mesure les concentrations de la substance d'essai dans les deux phases.

9. La méthode du brassage lent, proposée ici, permet de réduire les difficultés expérimentales associées à la formation de micro-gouttelettes dans la méthode par agitation en flacon. Avec le brassage lent, l'eau, le 1-octanol et la substance d'essai s'équilibrent dans un réacteur thermostaté soumis à une agitation douce. Les échanges entre les phases sont accélérés par le brassage. Ce dernier produit une légère turbulence qui favorise les échanges entre le 1-octanol et l'eau sans provoquer la formation de gouttelettes (1).

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

10. La présence de substances autres que la substance d'essai risquant d'influencer le coefficient d'activité de la substance d'essai, celle-ci doit être testée à l'état pur. Il convient d'employer une substance d'essai présentant le degré de pureté le plus élevé que l'on puisse trouver dans le commerce.

11. Cette méthode s'applique aux substances pures qui ne se dissocient ni s'associent et qui ne manifestent aucune activité interfaciale sensible. Cette méthode convient également aux mélanges. Le cas échéant, les coefficients de partage 1-octanol/eau déterminés varient en fonction de la composition chimique du mélange testé et de la composition électrolytique employée comme phase aqueuse. A condition de prendre certaines mesures supplémentaires, cette méthode peut aussi s'appliquer à des substances qui se dissocient ou s'associent (paragraphe 12).

12. Le partage des substances sujettes à la dissociation, telles que les acides organiques et les phénols, les bases organiques et les composés organométalliques, entre l'eau et le 1-octanol comportant de multiples équilibres dans ces phases, le P_{oe} est une constante conditionnelle qui dépend fortement de la composition électrolytique (6)(7). D'où la nécessité de contrôler le pH et la composition électrolytique lors de la détermination du P_{oe} et de rapporter les valeurs de ces deux paramètres. L'évaluation de ces coefficients de partage doit être confiée à un expert. Il convient de sélectionner des valeurs de pH appropriées d'après la valeur de la ou des constantes de dissociation, afin d'établir un coefficient de partage pour chaque état d'ionisation. Les composés organométalliques doivent être testés à l'aide de tampons non complexants (7). À la lumière des connaissances actuelles en matière de chimie en phase aqueuse (constantes de complexation et de dissociation), on choisira des conditions expérimentales permettant d'estimer la formation d'espèces par la substance d'essai en phase aqueuse. Il faut instaurer une force ionique identique dans toutes les expériences en employant un électrolyte de fond.

13. Les substances peu solubles dans l'eau ou présentant un P_{oe} élevé peuvent engendrer des problèmes dus au fait que leurs concentrations dans l'eau sont si faibles qu'il devient difficile de les déterminer avec exactitude. Cette Ligne directrice livre des indications sur la manière de traiter ce problème.

INFORMATIONS SUR LA SUBSTANCE D'ESSAI

14. Le degré de pureté des réactifs chimiques doit au moins correspondre à celui de la qualité pour analyse. Il est recommandé d'utiliser des substances d'essai non marquées de composition chimique connue et d'une pureté d'au moins 99% ou des substances d'essai radiomarquées de composition chimique et pureté radiochimique connues. S'il s'agit de traceurs à demi-vie courte, on appliquera des corrections pour tenir compte de la désintégration. Si la substance d'essai est radiomarquée, il y a lieu d'employer une méthode analytique spécifique à la substance de telle sorte que la radioactivité mesurée se rapporte directement à la substance d'essai.

15. Il est possible d'estimer le $\log P_{oe}$ avec les logiciels vendus dans le commerce à cet effet, ou en s'appuyant sur le rapport des solubilités dans les deux solvants.

16. Avant de déterminer le P_{oe} par la méthode du brassage lent, il faut disposer des informations suivantes sur la substance d'essai :

1. formule structurale ;
2. méthodes analytiques appropriées à la détermination de la concentration de la substance dans l'eau et dans le 1-octanol ;
3. constante(s) de dissociation des substances ionisables [Ligne directrice 112 de l'OCDE] (8) ;
4. solubilité dans l'eau [Ligne directrice 105 de l'OCDE] (9) ;

5. hydrolyse abiotique [Ligne directrice 111 de l'OCDE] (10) ;
6. biodégradabilité immédiate [Ligne directrice 301 de l'OCDE] (11) ;
7. pression de vapeur [Ligne directrice 104 de l'OCDE] (12).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Matériel et appareillage

17. Cette expérience nécessite du matériel courant de laboratoire, et en particulier :
 - des agitateurs magnétiques et des barres d'agitation magnétiques recouvertes de Teflon pour agiter la phase aqueuse ;
 - des instruments d'analyse permettant de déterminer la concentration de la substance d'essai aux concentrations attendues ;
 - une bouteille à agiter munie d'un robinet à sa base. Suivant l'estimation du $\log P_{oe}$ et le seuil de détection de la substance d'essai, on envisagera d'utiliser un réacteur d'un volume supérieur à un litre, de la même géométrie, de manière à obtenir un volume d'eau suffisant pour l'extraction et l'analyse chimiques de la substance d'essai. La concentration de la substance d'essai dans l'extrait aqueux sera donc plus élevée, ce qui rendra la détermination analytique plus fiable. Un tableau reproduisant des estimations du volume minimal requis, le seuil de détection de la substance, l'estimation de son $\log P_{oe}$ et sa solubilité dans l'eau figure en Annexe 1. Ce tableau se fonde sur la relation entre le $\log P_{oe}$ et le rapport des solubilités dans l'octanol et dans l'eau, telle que présentée par Pinsuwan et al. (13) :

$$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,41$$

où SR représente le rapport S_{oct}/S_e (en molarité) ;

et sur la relation donnée par Lyman (15) pour prédire la solubilité dans l'eau. Les solubilités dans l'eau calculées avec l'équation donnée à l'Annexe 1 sont à considérer comme une première estimation. Notons que l'utilisateur est libre d'estimer la solubilité dans l'eau à l'aide de n'importe quelle autre relation jugée mieux représenter la relation entre l'hydrophobie et la solubilité. S'agissant des substances solides, l'inclusion du point de fusion dans la prédiction de la solubilité est par exemple recommandée. Si l'on utilise une équation modifiée, il faut vérifier que l'équation permettant de calculer la solubilité dans l'octanol est toujours valable. Une bouteille à agiter recouverte d'une enveloppe de verre et d'une capacité d'environ un litre est schématisée en Annexe 2. Les proportions de la bouteille représentée en Annexe 2 se sont avérées propices et doivent être conservées si la dimension de l'appareil est modifiée ;

- Il est essentiel de maintenir la température constante durant le brassage lent à l'aide d'un dispositif adéquat.
18. Les récipients doivent être composés d'un matériau inerte rendant négligeable l'adsorption à la surface des récipients.

Préparation des solutions expérimentales

19. La détermination du P_{oe} requiert un 1-octanol de la qualité la plus pure qui puisse se trouver dans le commerce (au moins 99%). Il est recommandé de purifier le 1-octanol

par une extraction réalisée avec un acide, une base et de l'eau, suivie d'un séchage. Le 1-octanol peut, en plus, être purifié par distillation. Les solutions étalons des substances d'essai doivent être préparées avec du 1-octanol purifié. L'eau destinée à la détermination du P_{oe} doit être distillée à l'aide d'un dispositif en verre ou en quartz, ou traitée par un système de purification, ou encore être de qualité HPLC. Il convient de filtrer l'eau distillée à travers des mailles de $0,22\ \mu\text{m}$ et d'inclure des blancs afin de s'assurer que les extraits concentrés ne renferment pas d'impuretés susceptibles d'interférer avec la substance d'essai. Si l'on emploie un filtre en fibres de verre, il faut le nettoyer en le laissant au moins trois heures dans un four à 400°C .

20. Afin de saturer chaque solvant par l'autre avant l'expérience, on les équilibre dans un récipient suffisamment grand. Pour ce faire, le système à deux phases est soumis à un brassage lent durant deux jours.

21. Une concentration appropriée de la substance d'essai est choisie et dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Il y a lieu de déterminer le coefficient de partage 1-octanol/eau dans des solutions diluées dans du 1-octanol et de l'eau. Aussi la concentration de la substance d'essai ne doit-elle pas excéder 70% de sa solubilité avec une concentration maximale de 0,1 M dans chaque phase (1). Les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience seront exemptes de substance d'essai en suspension à l'état solide.

22. La quantité appropriée de substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau). Si l'estimation du $\log P_{oe}$ est supérieure à 5, il faut s'assurer que les solutions de 1-octanol utilisées pour l'expérience ne renferment pas de substance d'essai en suspension à l'état solide. À cette fin, la procédure suivante est appliquée pour les substances chimiques dont la valeur estimée de $\log P_{oe} > 5$:

- la substance d'essai est dissoute dans du 1-octanol (saturé avec de l'eau) ;
- on laisse reposer la solution suffisamment longtemps pour que la substance suspendue à l'état solide se dépose. Durant la décantation, la concentration de la substance d'essai est mesurée en continu ;
- une fois que les concentrations mesurées dans la solution de 1-octanol ont atteint une valeur stable, la solution mère est diluée avec un volume approprié de 1-octanol ;
- la concentration de la solution mère diluée est mesurée. Si la concentration mesurée concorde avec la dilution, la solution mère diluée peut être utilisée dans le processus expérimental du brassage lent.

Extraction et analyse des échantillons

23. Le dosage de la substance d'essai s'effectue par une méthode analytique validée. Les chercheurs doivent prouver que, durant l'essai, les concentrations dans le 1-octanol saturé avec de l'eau et dans la phase aqueuse saturée avec du 1-octanol sont supérieures au seuil de quantification du procédé analytique employé. Il y a lieu d'établir avant l'essai le taux de récupération par l'analyse de la substance d'essai en phase aqueuse et en phase 1-octanol, dans les cas où des méthodes d'extraction s'avèrent nécessaires. Le signal analytique doit être corrigé en fonction des blancs et l'on veillera à éviter tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre.

24. Les concentrations des substances d'essai hydrophobes étant plutôt faibles en phase aqueuse, il faudra probablement extraire la substance de la phase aqueuse à l'aide d'un

solvant organique et préconcentrer l'extrait avant analyse. Pour la même raison, il est nécessaire de réduire les éventuelles concentrations du blanc. A cette fin, on emploie des solvants très purs, de préférence des solvants pour l'analyse des résidus. En outre, un nettoyage soigneux (par exemple lavage au solvant ou cuisson à haute température) de la verrerie avant l'expérience peut diminuer le risque de contamination croisée.

25. Il est possible d'estimer le $\log P_{oe}$ à l'aide d'un programme d'estimation ou en faisant appel à un expert. Si sa valeur est supérieure à six, d'une part il convient d'être très attentif aux corrections en fonction du blanc et à tout transfert de la substance à analyser d'un échantillon à l'autre et, d'autre part, il est impératif d'utiliser un étalon de substitution pour corriger le taux de récupération, de façon à pouvoir atteindre des facteurs de préconcentration élevés. Plusieurs logiciels d'estimation du $\log P_{oe}$ se trouvent dans le commerce¹, par exemple Clog P (15), KOWWIN (16), ProLogP (17) et ACD logP (18). Les références (19-21) décrivent les différents procédés d'estimation.

26. Les seuils de quantification pour la détermination de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau sont établis suivant des méthodes acceptées. Comme principe de base, le seuil de quantification de la méthode employée peut être considéré comme étant la concentration dans l'eau ou le 1-octanol qui produit un rapport signal/bruit de dix. Il convient de choisir des méthodes d'extraction et de préconcentration appropriées et de spécifier le taux de récupération de l'analyse. Le facteur de préconcentration doit être choisi de façon à produire un signal de l'intensité requise lors de la détermination analytique.

27. En fonction des paramètres de la méthode analytique et des concentrations escomptées, on détermine le volume de l'échantillon qui permettra de déterminer avec exactitude la concentration de la substance d'essai. L'utilisation d'échantillons aqueux trop petits pour obtenir un signal analytique suffisant est à éviter. Les échantillons aqueux ne doivent pas non plus être trop grands, car le volume d'eau restant risquerait d'être insuffisant pour le nombre minimal d'analyses requises ($n = 5$). L'Annexe 1 indique les volumes minimaux des échantillons en fonction du volume du récipient, du seuil de détection de la substance d'essai et de sa solubilité.

28. La quantification des substances d'essai s'effectue par comparaison avec les courbes d'étalonnage des substances d'essai. Les concentrations des étalons doivent figurer entre parenthèses à côté des concentrations relevées dans les échantillons analysés.

29. Pour les substances d'essai dont le $\log P_{oe}$ estimé est supérieur à six, on verse un étalon de substitution dans l'échantillon aqueux avant l'extraction afin de relever les pertes survenues durant l'extraction et la préconcentration des échantillons aqueux. Pour que la correction du taux de récupération soit correcte, les étalons de substitution doivent avoir des propriétés très semblables ou identiques à celles de la substance d'essai. A cette fin, on utilise de préférence des analogues isotopiques (stables) marqués de la substance d'essai (perdeutériés ou marqués au ^{13}C , par exemple). Si l'utilisation d'un isotope marqué stable, c'est-à-dire marqué au ^{13}C ou au ^2H , est impossible, il faut démontrer, en s'appuyant sur des données fiables tirées de publications, que les propriétés physico-chimiques de l'étalon de substitution sont très proches de celles de la substance d'essai. Des émulsions peuvent se former au cours de l'extraction liquide-liquide de la phase aqueuse. Pour réduire ce phénomène, on peut ajouter du sel et laisser reposer l'émulsion toute une nuit. Les méthodes utilisées pour extraire et préconcentrer les échantillons doivent être mentionnées.

¹ Cette information n'est fournie qu'à titre indicatif. D'autres logiciels équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils produisent les mêmes résultats.

30. Les échantillons prélevés dans la phase 1-octanol peuvent, si nécessaire, être dilués avec un solvant adéquat avant l'analyse. De plus, l'utilisation d'étalons de substitution pour corriger la récupération est recommandée pour les substances qui se sont avérées présenter un degré de variation élevé lors des essais de récupération (écart-type relatif supérieur à 10%).

31. Les détails de la méthode analytique devront figurer dans le rapport. Ceux-ci incluent la méthode d'extraction, les facteurs de préconcentration et de dilution, les paramètres des instruments, le processus d'étalonnage, la gamme d'étalonnage, la récupération de la substance d'essai présente dans l'eau par un procédé analytique, l'ajout d'étalons de substitution pour corriger le taux de récupération, les valeurs des blancs, les seuils de détection et les seuils de quantification.

Déroulement de l'essai

Rapports volumiques 1-octanol/eau optimaux

32. Les volumes d'eau et de 1-octanol sont choisis en fonction du seuil de quantification dans le 1-octanol et dans l'eau, des facteurs de préconcentration appliqués aux échantillons aqueux, des volumes prélevés dans le 1-octanol et dans l'eau et des concentrations prévues. Pour des raisons expérimentales, le volume de 1-octanol employé dans le système de brassage lent doit être choisi de telle sorte que la couche de 1-octanol soit suffisamment épaisse (> 0,5 cm) pour qu'un prélèvement puisse s'effectuer dans la phase 1-octanol sans la perturber.

33. Les rapports volumiques utilisés couramment pour analyser des substances dont le $\log P_{oe}$ est supérieur ou égal à 4,5 sont de 20 à 50 ml de 1-octanol et de 950 à 980 ml d'eau dans un récipient d'un litre.

Conditions expérimentales

34. Durant l'essai, le réacteur est thermostaté de manière à limiter la variation de température à moins de 1 °C. L'essai doit être conduit à 25 °C.

35. On protège le système expérimental de la lumière du jour en effectuant l'essai dans une pièce obscure ou en recouvrant le réacteur d'une feuille d'aluminium.

36. L'essai doit être mené dans un environnement aussi dépoussiéré que possible.

37. Le système 1-octanol/eau est agité jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint. Le temps requis pour atteindre l'équilibre est évalué au moyen d'un essai pilote de brassage lent au cours duquel on prélève de l'eau et de l'octanol périodiquement. Les temps de prélèvement doivent être espacés d'au moins cinq heures.

38. Chaque détermination du P_{oe} doit s'effectuer sur la base d'au moins trois essais de brassage lent indépendants.

Détermination du temps requis pour parvenir à l'équilibre

39. On admet que l'équilibre est atteint lorsque la régression du rapport des concentrations dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps (la variable temps comprenant quatre points) se traduit par une pente ne s'écartant pas de manière significative de zéro pour une valeur de p égale à 0,05. Le temps minimal requis pour atteindre l'équilibre avant de pouvoir commencer les prélèvements est d'un jour. En principe, le prélèvement des substances dont le $\log P_{oe}$ estimé est inférieur à cinq peut s'effectuer au cours des deuxième et troisième jours. Il est possible que le temps pour parvenir à l'équilibre soit plus

long pour les substances plus hydrophobes. Pour une substance ayant un $\log P_{oc}$ égal à 8,23 (décachlorobiphényle), 144 heures ont été suffisantes pour atteindre l'équilibre. L'équilibre est évalué par une série de prélèvements effectués dans le même récipient.

Début de l'essai

40. On commence par remplir le réacteur avec de l'eau saturée en 1-octanol. Ensuite, on attend que le système atteigne la température requise par le thermostat.

41. La quantité voulue de substance d'essai (dissoute dans le volume requis de 1-octanol saturé en eau) est ajoutée soigneusement au réacteur. Il s'agit d'une étape critique de l'essai car il faut éviter le mélange turbulent des deux phases. A cette fin, la phase 1-octanol peut être versée doucement à l'aide d'une pipette sur la paroi du récipient d'essai, à proximité de la surface de l'eau. Elle ruissellera ainsi le long de la paroi et formera un film au dessus de la phase aqueuse. Il faut toujours éviter de décanter le 1-octanol directement dans la bouteille ; on ne peut pas faire tomber des gouttes de 1-octanol directement dans l'eau.

42. Une fois l'agitation lancée, on augmente lentement sa vitesse. Si les moteurs de l'agitateur ne peuvent être réglés correctement, on envisagera d'utiliser un transformateur. La vitesse d'agitation doit être réglée de manière à créer un vortex à l'interface entre l'eau et le 1-octanol d'une profondeur de 0,5 à 2,5 cm au maximum. Il faut diminuer la vitesse d'agitation si la profondeur du vortex dépasse 2,5 cm, sinon des micro-gouttelettes de 1-octanol peuvent se former dans la phase aqueuse et donner lieu à une surestimation de la concentration de la substance d'essai dans l'eau. D'après les résultats d'un essai tournant de validation (4), on recommande d'appliquer une vitesse maximale d'agitation de 2,5 cm. Elle représente un compromis permettant de parvenir rapidement à l'équilibre tout en limitant la formation de micro-gouttelettes de 1-octanol.

Prélèvement et traitement des échantillons

43. Il convient d'arrêter l'agitateur avant d'effectuer les prélèvements et d'attendre que les liquides s'immobilisent. Lorsque le prélèvement est terminé, l'agitateur est remis en marche doucement, comme décrit plus haut ; après quoi on augmente la vitesse d'agitation progressivement.

44. La phase aqueuse est prélevée à un robinet situé à la base du réacteur. Il faut toujours éliminer le volume mort d'eau contenu dans les robinets (environ 5 ml pour le récipient illustré à l'Annexe 2). L'eau retenue dans les robinets n'est pas agitée et donc pas en équilibre avec l'ensemble. On note le volume des échantillons aqueux et on vérifie que la quantité de substance d'essai présente dans l'eau éliminée est prise en compte dans l'établissement du bilan massique. Il y a lieu de réduire au minimum les pertes par évaporation en permettant à l'eau de s'écouler doucement dans l'entonnoir séparateur de façon à ne pas perturber la couche eau/1-octanol.

45. On prélève les échantillons de 1-octanol en aspirant une petite aliquote (environ 100 μ l) de la couche 1-octanol au moyen d'une seringue de 100 microlitres en verre et métal. Il faut veiller à ne pas perturber l'interface. Le volume de liquide prélevé est consigné. Une petite aliquote suffit, étant donné que l'échantillon de 1-octanol sera dilué.

46. Les étapes inutiles de transfert d'échantillons sont à éviter. Aussi le volume des échantillons est-il déterminé par gravimétrie. Dans le cas des échantillons aqueux, cette détermination s'effectue par la collecte de l'échantillon aqueux dans un entonnoir séparateur contenant déjà le volume de solvant requis.

RÉSULTATS ET RAPPORT

47. La présente Ligne directrice prescrit de déterminer le P_{oe} en conduisant trois essais à brassage lent (trois unités expérimentales) dans des conditions expérimentales identiques. La régression utilisée pour démontrer que l'équilibre a été atteint doit s'appuyer sur les résultats d'au moins quatre déterminations du rapport C_o/C_e effectuées à quatre moments ponctuels successifs. La variance ainsi calculée correspond à une mesure de l'incertitude de la valeur moyenne obtenue pour chaque unité expérimentale.

48. Le P_{oe} peut être caractérisé par la variance des données recueillies pour chaque unité expérimentale. Cette information est employée pour calculer le P_{oe} en considérant qu'il équivaut à la moyenne pondérée des résultats de chaque unité expérimentale. Pour ce faire, l'inverse de la variance des résultats des unités expérimentales est employé comme coefficient pondérateur. Ainsi, les données accusant une forte variation (exprimée par la variance), qui sont donc moins fiables, ont moins d'influence sur le résultat que les données offrant une variance faible.

49. L'écart-type pondéré est calculé d'une manière analogue. Il caractérise la répétabilité de la mesure du P_{oe} . Un écart-type pondéré faible traduit une répétabilité élevée de la détermination du P_{oe} au sein d'un même laboratoire. Le traitement statistique formel des données est résumé ci-dessous.

Traitement des résultats

Démonstration de la réalisation de l'équilibre

50. Le logarithme du rapport des concentrations de la substance d'essai dans le 1-octanol et dans l'eau ($\log C_o/C_e$) est calculé pour chaque instant de prélèvement. On démontre que l'équilibre chimique est atteint en traçant une courbe de ce rapport en fonction du temps. L'apparition d'un plateau sur ce tracé, établi à partir d'au moins quatre points consécutifs sur l'axe du temps, indique que l'équilibre a été atteint et que le composé est complètement dissous dans le 1-octanol. Dans le cas contraire, il faut poursuivre l'essai jusqu'à ce que quatre points de temps successifs présentent une pente qui n'est pas significativement différente de zéro, pour une valeur de $p = 0,05$, montrant ainsi que le $\log C_o/C_e$ est indépendant du temps.

Calcul du log P_{oe}

51. La valeur du $\log P_{oe}$ de l'unité expérimentale correspond à la moyenne pondérée du $\log C_o/C_e$ pour la partie de la courbe du $\log C_o/C_e$ en fonction du temps, pour laquelle l'état d'équilibre a été démontré. On calcule la moyenne pondérée en pondérant les données avec l'inverse de la variance de telle sorte que l'influence des données sur le résultat final est inversement proportionnelle à l'incertitude des données.

Moyenne des log P_{oe}

52. La valeur moyenne du $\log P_{oe}$ de différentes unités expérimentales correspond à la moyenne des résultats de chaque unité expérimentale pondérés avec leurs variances respectives.

Le calcul répond à la formule suivante :

$$\log P_{oe,moy} = (\sum w_i \times \log P_{oe,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

où

$\log P_{oe,i}$ est la valeur du $\log P_{oe}$ de chaque unité expérimentale i ;

$\log P_{oe,moy}$ est la moyenne pondérée de tous les $\log P_{oe,i}$;

w_i est le poids statistique attribué à la valeur $\log P_{oe}$ de l'unité expérimentale i .

L'inverse de la variance de $\log P_{oe,i}$ est représentée par w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{oe,i})^{-1}$).

53. L'estimation de l'erreur de la moyenne de $\log P_{oe}$ correspond à la répétabilité des $\log C_o/C_e$ déterminés durant la phase d'équilibre dans chaque unité expérimentale. Elle se traduit par l'écart-type pondéré du $\log P_{oe,moy}$ ($\sigma_{\log P_{oe,moy}}$) qui mesure l'erreur associée au $\log P_{oe,moy}$. L'écart-type pondéré peut être calculé à partir de la variance pondérée ($\text{var}_{\log P_{oe,moy}}$) de la façon suivante :

$$\text{var}_{\log P_{oe,moy}} = (\sum w_i \times (\log P_{oe,i} - \log P_{oe,moy})^2) \times (\sum w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{oe,moy}} = (\text{var}_{\log P_{oe,moy}})^{0,5}$$

où n représente le nombre d'unités expérimentales.

Rapport d'essai

54. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

Substance d'essai :

- nom courant, nom chimique, numéro CAS, formule structurale (montrant la position du radiomarqueur, le cas échéant) et propriétés physico-chimiques pertinentes (voir paragraphe 17) ;
- pureté (impuretés) de la substance d'essai ;
- pureté radiochimique des substances marquées et activité molaire (s'il y a lieu) ;
- estimation préliminaire du $\log P_{oe}$ et méthode utilisée pour ce calcul.

Conditions expérimentales :

- dates de la réalisation des études ;
- température à laquelle s'est déroulé l'essai ;
- volumes de 1-octanol et d'eau au début de l'essai ;
- volumes des échantillons de 1-octanol et d'eau prélevés ;
- volumes de 1-octanol et d'eau restant dans les récipients expérimentaux ;
- description des récipients expérimentaux et des conditions d'agitation utilisées (géométrie de la barre d'agitation et du récipient expérimental, hauteur du vortex en mm et vitesse d'agitation si elle est connue) ;
- méthodes analytiques utilisées pour déterminer la substance d'essai et seuil de quantification de la méthode ;
- heures de prélèvement ;

- pH de la phase aqueuse et tampons utilisés, lorsqu'on a ajusté le pH pour des molécules ionisables ;
- nombre d'expériences identiques.

Résultats :

- répétabilité et sensibilité des méthodes analytiques employées ;
- concentrations de la substance d'essai déterminées dans le 1-octanol et dans l'eau en fonction du temps ;
- démonstration du bilan massique ;
- température et écart-type ou gamme de températures appliquée durant l'essai ;
- régression du rapport des concentrations en fonction du temps ;
- valeur moyenne de $\log P_{oc,moy}$ et son écart-type ;
- analyse et interprétation des résultats ;
- exemples de données brutes d'une analyse représentative (toutes les données brutes doivent être conservées conformément aux bonnes pratiques de laboratoire), notamment le taux de récupération des produits de substitution, le nombre de niveaux appliqué à l'étalonnage (ainsi que les critères régissant le coefficient de corrélation de la courbe d'étalonnage) et résultats de l'AQ/CQ ;
- s'il est disponible : rapport de validation du protocole expérimental (à mentionner parmi les références).

2. BIBLIOGRAPHIE

1. De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. *Environ. Toxicol. Chem.* **8**: 499-512.
2. OCDE (1995) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 107 Coefficient de partage (n-octanol/eau) : méthode par agitation en flacon. Paris.
3. OCDE (2004) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 117 Coefficient de partage (n-octanol/eau) : méthode HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance). Paris.
4. Tolls J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
5. Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.
6. Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.
7. Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 2596-2602.
8. OCDE (1981) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 112 Constante de dissociation dans l'eau (Méthode par dosage - Méthode spectrophotométrique - Méthode conductimétrique). Paris.
9. OCDE (1995) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 105 Solubilité dans l'eau. Paris.
10. OCDE (2004) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 111 Hydrolyse en fonction du pH. Paris.
11. OCDE (1992) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 301 Biodégradabilité facile. Paris.
12. OCDE (1995) Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques: 104 Pression de vapeur. Paris.
13. Pinsuwan, S., Li, A. and Yalkowsky, S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.*, **40**: 623-626.
14. Lyman WJ. (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.
15. Leo A, Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
16. Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
17. Compudrug L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

18. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
19. Lyman WJ. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
20. Rekker RF, de Kort HM. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
21. Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*, 386-390.

ANNEXE 1

Tables permettant de calculer les volumes d'eau minimaux requis pour détecter des substances d'essai ayant différentes valeurs de log P_{oe} en phase aqueuse

Hypothèses :

- Volume maximal de chaque aliquote = 10% du volume total ; 5 aliquotes = 50% du volume total.
- Concentration des substances d'essai = 0,7 x solubilité dans chaque phase. Si les concentrations sont inférieures, il faudra utiliser de plus grands volumes.
- Volume utilisé pour la détermination du seuil de détection = 100 ml
- Le log P_{oe} en fonction du log S_e et le log P_{oe} en fonction de SR (S_{oct}/S_e) sont des représentations raisonnables de relations pour les substances d'essai.

Estimation de S_e			
log P_{oe}	équation	log S_e	S_e (mg/L)
4	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \cdot \log P_{oe} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

Estimation de S_{oct}		
log P_{oe}	équation	S_{oct} (mg/L)
4	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{oe} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

Masse totale de la substance d'essai (mg)	Masse_{oct}/Masse_{eau}	Masse_{H2O}	Conc_{H2O}	Masse_{oct}	Conc_{oct}
		(mg)	(mg/L)	(mg)	(mg/L)
1319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1686	1664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2158	5263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2762	16644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3535	52632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4524	166436	0,0272	0,0286	4 524	90 480

5790	526316	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7411	1664357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9486	5263158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Calcul des volumes**Volume minimum requis pour la phase H₂O à chaque concentration du seuil de détection (mL)**

log P _{oe}	Seuil de détection (microgrammes/L)→	0.001	0.01	0.10	1.00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)		0,1				

Légende pour les calculs

Représente <10% du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 1 litre.

Représente <10% du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 2 litres.

Représente <10% du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 5 litres.

Représente <10% du volume total de la phase aqueuse, récipient d'équilibrage de 10 litres.

Dépasse 10% y compris du récipient d'équilibrage de 10 litres.

Vue d'ensemble des volumes requis en fonction de la solubilité dans l'eau et du log P_{oe}

log P _{oe}	S _e (mg/L)	Volume minimal requis pour la phase H ₂ O à chaque concentration du seuil de détection (mL)					
		Seuil de détection (microgrammes/L) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1485,43	14854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1269,59	12695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2539,18	25391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5078,36	50783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2170,25	21702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4340,49	43404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9042,69	90426,93
	0,003		18,09	180,85	1808,54	18085,39	180853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7728,85	77288,50
	0,003		15,46	154,58	1545,77	15457,70	154577,01
	0,0015		23,19	231,87	2318,66	23186,55	231865,51
	0,001		46,37	463,73	4637,31	46373,10	463731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1981,77	19817,73	198177,33
	0,001		39,64	396,35	3963,55	39635,47	396354,66
	0,0005		79,27	792,71	7927,09	79270,93	792709,32
	0,00025		158,54	1585,42	15854,19	158541,86	1585418,63
8	0,001		33,88	338,77	3387,68	33876,77	338767,72
	0,0005		67,75	677,54	6775,35	67753,54	677535,44
	0,00025		135,51	1355,07	13550,71	135507,09	1355070,89
	0,000125		271,01	2710,14	27101,42	271014,18	2710141,77
Volume utilisé pour le seuil de détection (L)		0,1					

ANNEXE 2

Figure 1. Exemple de récipient expérimental à enveloppe de verre destiné à la détermination du p_{oe} par la méthode du brassage lent

