

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

---

**« Liposolubilité des Substances Solides et Liquides »**  
(Méthode du flacon)**1. INTRODUCTION**• Connaissance requise

- Nécessité d'une méthode analytique appropriée

• Informations générales

- Coefficient de partage
- Hydrosolubilité
- Formule structurale
- Courbe de pression de vapeur
- Stabilité à 50°C

• Coefficient de variation

Le coefficient de variation des valeurs moyennes reportées par les participants aux travaux de l'OCDE pour la comparaison des essais en laboratoire, partie I, 1979, semble dépendre de la nature des produits chimiques testés ; il varie de 0,035 à 0,244.

• Conditions particulières

- Cette méthode d'essai ne peut être appliquée qu'à des substances pures.
- Elle n'est applicable qu'aux substances qui sont stables à 50°C pendant au moins 24 heures et qui, dans ces mêmes conditions, ne sont pas volatiles de façon appréciable. Les graisses et les huiles naturelles ne doivent pas être utilisées pour la détermination de la liposolubilité car leur composition n'est pas exactement connue.
- La méthode n'est pas applicable aux substances d'essai qui réagissent avec les triglycérides.

• Recommandation

On doit rechercher les relations qui existent entre la liposolubilité, le coefficient de partage et la bioaccumulation d'une substance.

- Documents de référence

Cette Ligne directrice pour les essais est basée sur la référence 4 du paragraphe 4, bibliographie.

## 2. MÉTHODE

### A. INTRODUCTION, OBJET, PORTÉE, PERTINENCE, APPLICATION ET LIMITES DE L'ESSAI

La liposolubilité d'une substance est une des données qui permet d'évaluer le stockage des matériaux lipidiques solubles, dans les tissus biologiques. Ce paramètre est particulièrement utile dans les cas où l'hydrosolubilité est trop faible pour permettre la mesure du coefficient de partage. Il est également applicable à l'étude de la migration des produits à partir des composants d'emballage vers les matériaux alimentaires.

- Définitions et unités

La fraction de masse de substance qui forme une phase homogène avec une graisse (une huile) liquide, sans qu'il y ait de réaction chimique, est définie comme la liposolubilité de cette substance. La valeur maximale de cette fraction de masse est appelée : fraction massique de saturation et elle est fonction de la température.

La composition des graisses diffère d'un organisme à un autre et même, à l'intérieur d'un même organisme. Puisqu'il est souhaitable de pouvoir comparer les résultats provenant de laboratoires différents, il est nécessaire d'employer une graisse de référence. Cette graisse de référence doit être similaire, du point de vue de sa composition et de son comportement, aux matériaux qu'on trouve dans la nature ; un mélange commercial de triglycérides, décrit dans l'annexe, répond à ces exigences, bien que tout autre mélange de triglycérides dont on pourrait montrer qu'il donne des résultats comparables puisse être utilisé.

La fraction massique de saturation d'une substance doit être donnée en g/kg de graisse étalon et rapportée à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Entre la solubilité en g par 1000 g de solution ( $S'$ ) et la solubilité en g par 1000 g de solvant ( $S$ ), existe la relation suivante :

$$S = \frac{1000 \cdot S'}{1000 - S'}$$

---

« **Liposolubilité des Substances Solides et Liquides** »

• Substances de référence

Quand on étudie une nouvelle substance, il n'est pas nécessaire d'utiliser à chaque fois les substances de référence. Elles sont surtout fournies pour pouvoir étalonner la méthode de temps en temps et elles permettent de comparer les résultats obtenus avec une autre méthode. Les valeurs présentées ici ne sont pas forcément représentatives des résultats qui peuvent être obtenus avec la méthode décrite ici, car ils ont été déduits d'une version antérieure de cette Ligne directrice pour les essais.

	Liposolubilité* [en g/1000 g (graisse)]
hexachlorobenzène	11,4 (11,1 - 12,1) (OCDE)
chlorure de mercure (II)	20,1 (14,7 - 24,3) (OCDE)
urée	0,17 (0,05 - 0,28) (CEE)

• Principe de la méthode

La substance est dissoute par agitation dans une « graisse de référence » liquide, et la fraction massique de saturation de la substance est déterminée par addition continue, jusqu'à ce que la variable dépendant de la fraction massique, mesurée par une méthode analytique appropriée, atteigne une valeur constante.

• Critères de qualité

***Reproductibilité***

A l'heure actuelle, la reproductibilité de la mesure est inconnue. Elle se révélera à partir du procédé analytique qui, en retour, est relié à la substance. Elle doit être donnée sous la forme d'une déviation standard autour de la moyenne, comme cela est indiqué ailleurs dans cette Ligne directrice pour les essais.

***Sensibilité***

La sensibilité de la méthode est déterminée par la sensibilité du processus analytique.

---

\* Moyenne totale et domaine de variation (entre parenthèses) des valeurs rapportées par les participants au programme de l'OCDE et de la CEE pour les travaux de comparaison des essais en laboratoire.

### *Spécificité*

Les résultats doivent s'appliquer à la « graisse de référence » et ils sont appropriés aux substances relativement pures. Même à 37°C, la graisse de référence peut former des émulsions ou une fine suspension de particules solides. Puisque ceci pourrait interférer avec la détermination ultérieure de la fraction massique, ceci doit être évité.

## B. MODE OPÉRATOIRE

### • Préparations

#### *Appareillage*

Le matériel suivant est nécessaire :

- verrerie normale de laboratoire
- balance
- centrifugeuse thermostatée
- agitateur qui peut être utilisé en combinaison avec un système de contrôle de la température
- thermostat

#### *Essai préliminaire*

Un essai préliminaire simplifié doit être effectué pour déterminer la quantité approximative de substance nécessaire pour établir la fraction massique de saturation à la température de l'essai (37°C).

Remarque : La vitesse d'établissement de l'équilibre de saturation peut dépendre largement de la taille des particules, dans le cas de substances solides. C'est pourquoi de tels matériaux doivent être pulvérisés.

#### *Préparation des substances*

Peser huit échantillons dans des récipients de 50 ml. Chacun de ces échantillons doit correspondre au double de la quantité nécessaire pour la saturation qui a été déterminée dans l'essai préliminaire.

Après avoir ajouté environ 25 g de graisse de référence liquéfiée et mélangée, les flacons fixés sur l'agitateur sont hermétiquement bouchés avec des bouchons en verre fritté. Une moitié des flacons (groupe I) est agitée à 30°C et l'autre moitié (groupe II) à environ 50°C pendant au moins une heure.

---

**« Liposolubilité des Substances Solides et Liquides »**

- Conditions expérimentales

La détermination de la liposolubilité est effectuée à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

- Exécution de l'essai

Agiter le contenu des flacons des deux groupes à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Il n'est pas possible de prédire de façon générale le temps d'agitation nécessaire pour établir l'équilibre. Dans le cas des substances liquides, la saturation peut être atteinte en quelques minutes. Dans le cas des substances solides, la saturation peut prendre des heures. Pour les liquides, trois heures d'agitation seront suffisantes, après quoi l'agitation doit être stoppée pour deux des flacons de chaque groupe qu'on laisse ensuite reposer pendant au moins une heure afin de séparer la partie de substance non dissoute et de laisser se former une phase homogène. Dans le cas où il apparaît une émulsion ou une suspension (par exemple, par effet Tyndall), celles-ci doivent être éliminées par une méthode appropriée telle que la centrifugation thermostatée.

On doit agiter les troisième et quatrième flacons de chacun des deux groupes pendant au moins 24 heures avant de les laisser reposer pendant une heure à  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Remarques : Si après ce laps de temps, aucun dépôt (pour les substances solides) ni aucune séparation de phase (pour les substances liquides) n'ont eu lieu, l'essai doit être répété avec une plus grande quantité de substance.

- Analyse

Pour l'analyse, on prélève un échantillon de chaque phase grasseuse saturée. Cet échantillon est pesé et on détermine la fraction massique grâce à une méthode analytique spécifique de la substance.

Pour cela, on peut utiliser toute méthode appropriée, par exemple :

- des méthodes photométriques
- la chromatographie gazeuse
- une extraction avec de l'eau suivie d'une détermination soit directement dans ce milieu, ou, après extraction en retour, par un solvant organique.

### 3. RÉSULTATS ET RAPPORT

#### • Calcul des résultats

S'il existe des différences significatives dans les résultats provenant de sous- ou de sur-saturation ou de périodes courtes ou longues, l'essai doit être répété avec des temps d'agitation plus longs.

#### • Rapport

Les résultats doivent être évalués comme cela est décrit ci-dessus, et ils font partie du rapport d'essai. S'il n'existe pas de différences significatives entre les diverses valeurs observées exprimées en grammes par kilogramme, on doit reporter les valeurs individuelles, la valeur moyenne et la déviation standard. S'il y a des différences significatives, même après avoir recommencé les essais, on ne doit alors reporter que les résultats individuels.

Les données suivantes doivent également être incluses dans le rapport sur la liposolubilité :

- substance (tous les détails concernant la préparation, l'identification, etc.)
- graisse (par exemple, description, caractéristiques, origine)
- méthode d'analyse, déviations et particularités.

### 4. BIBLIOGRAPHIE

1. H. Rheinbold dans Houben : *Die Methoden der organischen Chemie*, vol. 1, p. 866, 1925.
2. H. Kienitz dans Houben-Weyl : *Methoden der organischen Chemie* 3/1, p. 219, 1955.
3. W.J. Mader, R.D. Vold et M.J. Vold dans J. Weissberger : *Technique of Organic Chemistry* I/I, p. 655, 1966.
4. ASTM D 2780, Essai pour la solubilité des gaz fixés dans les liquides.

**5. ANNEXE**GRAISSE DE RÉFÉRENCE

Une graisse de référence, disponible commercialement auprès de la compagnie NATEC, Gesellschaft für naturwissenschaftlich-technische Dienste mbH, Behringstrasse 154, D-2000 Hambourg 50, est l'HB 307. Ce produit qui simule une graisse est un mélange synthétique de triglycérides saturés avec un acide gras et il possède une répartition en triglycérides analogue à celle d'une graisse de noix de coco.

Le tableau suivant montre la composition d'un lot typique de HB 307 :

*Distribution en acides gras*

Nombre d'atomes de C dans la partie acides gras	6	8	10	12	14	16	18	autres
zones GLC (%)	0,5	7,5	10,3	50,4	13,9	7,8	8,6	1

*Distribution en glycérides*

Nombre total d'atomes de C dans les parties acides gras		22	24	26	28	30	32	34	36	38
zones GLC (%)	0,1	0,3	1,0	2,3	4,9	10,9	13,9	21,1	16,1	
	40	42	44	46	48	50				
	11,7	9,8	4,4	2,2	1,1	0,2				

*Pureté*

Taux en monoglycérides (enzymatiques)	≤ 0,1%
Taux en diglycérides (enzymatiques)	≤ 0,4%
Taux en composés insaponifiables	≤ 0,1%
Nombre de Wijs	≤ 0,5
Nombre d'acides	0,02
Taux en eau (K. Fischer)	≤ 0,1%
Point de fusion clair	28,5°C

Spectre d'absorption typique (épaisseur de la couche d = 1 cm, comparaison : eau, 35°C)

Longueur d'onde (nm)	290	310	330	350	370	390	430	470	510
Transmission (%)	2	15	37	64	80	88	95	97	98

Au moins 10% de transmission de lumière à 303 nm.