

SÉPARATION DES ISOMÈRES GÉOMÉTRIQUES D'ACIDES GRAS MONOÉTHYLÉNIQUES SUR COUCHE MINCE DE TALC. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

JEAN-PAUL CARREAU ET JEANINE RAULIN

*Centre de Recherches sur la Nutrition du C.N.R.S.,
Belleuve, S. & O. (France)*

(Reçu le 4 octobre 1963)

INTRODUCTION

Certains procédés ont été publiés pour séparer les acides gras élaïdisés des isomères dont les liaisons éthyléniques sont de forme *cis*. Il en existe peu, à notre connaissance, qui permettent d'isoler rapidement l'une ou l'autre de ces formes géométriques sans avoir recours à plusieurs opérations intermédiaires.

La méthode de JANTZEN ET ANDREAS¹ fait appel à la préparation de composés d'addition: dérivés acétoxymercuriméthoxy- des esters d'acides gras. Ces dérivés se forment 10 fois plus lentement à partir des acides gras insaturés de forme *trans* qu'avec ceux de forme *cis*. D'après MANGOLD², on peut utiliser la chromatographie en couche mince de gel de silice pour séparer le composé d'addition qui s'est formé rapidement à partir des esters d'acides gras de forme *cis* et les esters (de forme *trans*) qui n'ont pas encore réagi avec l'acétate mercurique. En pratique, la résolution de ces deux taches s'effectue très difficilement.

Une autre méthode de séparation est celle décrite par DE VRIES^{3,4}. Elle est basée sur la formation de complexes $Ag +$ alcène, qui se forment facilement sur les liaisons éthyléniques *cis*, difficilement sur les *trans*. SCHOLFIELD *et al.*^{5,6} se basent sur le même principe pour séparer les esters d'acides *cis* et *trans* par fractionnement à contre-courant. Ces procédés exigent une ou plusieurs opérations supplémentaires pour la récupération des acides gras à partir du complexe formé.

Nous nous proposons de décrire ici une méthode, par simple chromatographie sur couche mince de talc, qui permet de séparer directement et de doser presque quantitativement les acides gras insaturés de forme *cis* et ceux de forme *trans* sans leur faire subir de préparation.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

On applique les mélanges d'acides gras insaturés (de forme *cis* et *trans*) au bas d'une chromatoplaque revêtue de substance peu polaire (silicate de magnésium) et on utilise la différence de vitesse de solubilisation de ces acides gras pour leur élution avec un mélange hydroalcoolique de solvants.

ANALYSE QUALITATIVE

Confection des chromatoplaques

On mélange dans un mortier: 40 g de talc du commerce* et 60 ml de *n*-propanol (ou isopropanol). On verse ce mélange dans un applicateur pour chromatographie en couches minces de type courant après l'avoir réglé à une hauteur de 0.25 mm. On l'étale sur cinq plaques de verre de 20 × 20 cm qu'on fait sécher à l'étuve à 105–110° pendant 20 min.

Application du mélange d'acides gras

On applique le mélange d'acides gras (environ 10 γ) de chaque constituant en solution dans un solvant léger (éther de pétrole par exemple).

Élution

L'élution à la température ambiante de 15–18° est faite à l'aide du mélange hydroalcoolique de 35 ml d'éthanol absolu et 1 goutte d'acide acétique glacial, complété à 50 ml avec de l'eau bi-distillée. Ces volumes et températures doivent être rigoureusement respectés pour obtenir une bonne résolution des différentes taches. L'élution dure de 5–6 h, temps nécessaire pour que le front du solvant arrive à 3 cm du haut de la plaque.

Révélation des plaques

On peut révéler par tous moyens couramment utilisés: vapeurs d'iode ou carbonisation par l'acide sulfurique à 50 % vaporisé sur la plaque, par exemple.

En opérant rigoureusement dans les conditions décrites ci-dessus on obtient les R_F suivants: acide oléique 0.80, acide élaïdique 0.40, l'acide gras saturé correspondant (stéarique) restant fixé sur la ligne de départ.

Influence de la composition du mélange éluant sur la chromatographie

(a) *Concentration de l'éthanol: action sur la valeur des R_F et sur la longueur des taches.* Les R_F varient très fortement avec la concentration de l'éthanol dans l'éluant ainsi que l'on peut s'en rendre compte par l'examen du Tableau I et de la Fig. 1.

TABLEAU I

Éthanol pour 50 ml d'éluant (ml)	R_F	
	Acide oléique	Acide élaïdique
25	0.50	—
30	0.70	0.10
35	0.80	0.45
40	0.95	0.75

La concentration de l'éthanol dans le milieu hydroalcoolique que nous avons choisie correspond à un système d'élution qui permet d'obtenir les taches les plus ramassées comme on peut le voir par l'examen du Tableau II et de la Fig. 2.

* L'origine du silicate de magnésium importe peu. Cependant nous utilisons de préférence un talc du commerce (Prolabo) débarrassé des débris organiques par lavage et qui adhère mieux aux plaques de verre qu'un produit pur tel que le silicate de magnésium synthétique (Johns Manville).

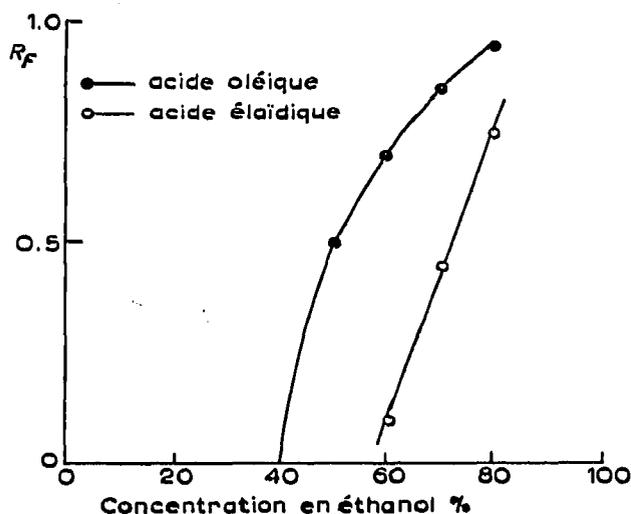


Fig. 1. Influence de la concentration de l'éthanol dans le mélange éluant sur le R_F des taches.

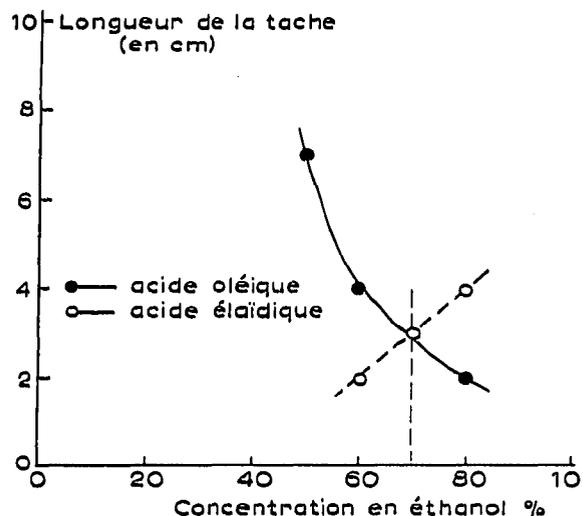


Fig. 2. Influence de la concentration de l'éthanol dans le mélange éluant sur la longueur des taches.

(b) *Acidité du mélange hydroalcoolique, action sur les R_F des acides gras élaïdés. En augmentant l'acidité du mélange éluant on augmente principalement le R_F des acides gras de forme *trans*.*

TABLEAU II

Éthanol pour 50 ml d'éluant (ml)	Longueur des taches (mm)	
	Acide oléique	Acide élaïdique
25	70	—
30	40	20
35	30	30
40	20	40

ANALYSE QUANTITATIVE

On peut séparer sur des plaques beaucoup plus épaisses des quantités d'acides gras éthyléniques de forme *cis* et de forme *trans* suffisantes pour les titrer et en effectuer une chromatographie en phase gazeuse.

Confection des chromatoplaques préparatives

On mélange dans un mortier: 150 g de talc du commerce et 200 ml de *n*-propanol (ou isopropanol). On verse ce mélange dans un applicateur du type de celui décrit par DAUVILLIER⁷ en le réglant à une hauteur de 1 mm. On étale sur 4 plaques de verre de 20 × 20 cm et on fait sécher à l'étuve à 105–110° jusqu'à complète évaporation du propanol.

Application du mélange d'acides gras

On peut appliquer en une seule bande au bas de chaque chromatoplaque jusqu'à 40 mg d'acides gras en solution dans l'éther de pétrole.

Élution

L'élution est faite à l'aide du mélange hydroalcoolique de 105 ml d'éthanol absolu et 2 gouttes d'acide acétique glacial, complété à 150 ml avec de l'eau distillée.

Localisation des taches

Les vapeurs d'iode révèlent instantanément les acides gras de forme *cis* plus lentement les acides gras élaïdisés.

Extraction des acides gras du chromatogramme préparatif

On récupère la poudre de talc imprégnée d'acides gras et l'on procède à leur extraction par un mélange de solvants (méthanol-chloroforme par exemple).

Dosage des acides gras

Le dosage des acides gras peut se faire avec une solution de soude 0.01 *N* à l'aide d'une microburette ou d'une seringue calibrée ou encore au pH-mètre.

Erreur effectuée par dosage titrimétrique

(a) *Mélange renfermant uniquement des acides gras monoéthyléniques.* On désire séparer les constituants d'une solution renfermant de l'acide oléique et de l'acide élaïdique à raison de 1 mg (soit 3.5 micro-équivalents) de chaque acide gras par ml. Le Tableau III

TABLEAU III

Volume de la solution d'acides gras (ml)	Volume théorique de NaOH à verser (ml)	Volume pratique de NaOH à verser (ml)	Erreur (%)
5	1.75	1.90	8
3	1.05	1.10	5
1	0.35	0.37	6
0.55	0.19	0.20	5

indique les erreurs que l'on obtient lorsque l'on effectue le dosage à l'aide d'une solution alcoolique de soude 0.01 *N* délivrée par une microburette à pointe plongeant dans la solution d'acides gras.

(b) *Mélange renfermant à la fois des acides gras mono- et diéthyléniques et des acides gras saturés.* On fait une solution renfermant (en moles): $0.49 \cdot 10^{-2}$ d'acide oléique, $0.12 \cdot 10^{-2}$ d'acide linoléique, $0.49 \cdot 10^{-2}$ d'acide palmitique, $0.12 \cdot 10^{-2}$ d'acide élaïdique, dont on effectue la séparation sur chromatoplaque de talc.

Comme les R_F des acides gras saturés sont voisins de ceux des acides gras élaïdisés, leurs bandes sont plus ou moins confondues. Pour récupérer les acides gras on procède alors de la façon suivante:

Fraction A: le quart supérieur de la plaque (mesuré entre la ligne de départ et celle du front) qui contient tous les acides gras de forme *cis*.

Fraction B: les trois-quart inférieurs qui renferment tous les acides gras de forme *trans* et les acides gras saturés.

On extrait alors les acides gras de ces fractions et on en effectue le dosage. Théoriquement, le rapport de la somme des acides gras de forme *cis* sur la somme des

acides gras *trans* et saturé est égal à 1. Le rapport des volumes de soude 0.01 *N* versée réellement :

$$\frac{0.65 \text{ ml (fraction A)}}{0.66 \text{ ml (fraction B)}}$$

est également voisin de l'unité.

L'erreur est plus sensible que pour l'exemple précédent puisqu'elle atteint 7 % (acides gras "*cis*") et même 9 % (acides gras "*trans*"). On pourrait la réduire en utilisant une méthode de titration après drainage du CO₂ par barbotage d'azote telle que celle décrite par SALAMAN ET ROBINSON⁸.

En associant la chromatographie gaz-liquide à la chromatographie sur couche mince de talc on détermine le pourcentage d'acides gras saturés extraits avec les acides gras de forme *trans*.

RÉSUMÉ

La séparation des isomères géométriques de ces acides gras insaturés est effectuée sur couche mince de talc du commerce par élution hydroalcoolique. Une méthode titrimétrique permet ensuite d'obtenir leur détermination quantitative. Cette technique, utilisée ou non en association avec la chromatographie gaz-liquide, fournit un moyen de connaître avec une approximation convenable la concentration en isomères *cis* et *trans* de mélanges d'acides gras complexes.

SUMMARY

This paper describes a method of thin-layer chromatography on commercial talc with which it is possible to separate elaidinized octadecamonoenoic and dienoic fatty acids from mixtures of saturated fatty acids and *cis* and *trans* forms of unsaturated fatty acids. By combining this method with gas-liquid chromatography, elaidic acid can be determined with good accuracy.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. JANTZEN ET H. ANDREAS, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1427.
- ² H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 708.
- ³ B. DE VRIES, 6ème Congrès de l'International Society for Fat Research, Londres, 1962.
- ⁴ B. DE VRIES, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40 (1963) 184.
- ⁵ C. R. SCHOLFIELD, E. P. JONES, R. D. BUTTERFIELD ET H. J. DUTTON, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 386.
- ⁶ B. SREENIVASAN, I. NOWAKOWSKA, E. P. JONES, E. SELKE, C. R. SCHOLFIELD, H. J. DUTTON, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40 (1963) 45.
- ⁷ P. DAUVILLIER, *J. Chromatog.*, 11 (1963) 405.
- ⁸ M. R. SALAMAN ET D. S. ROBINSON, dans P. DESNUELLE (Editeur), *The Enzymes of Lipid Metabolism*, Pergamon, Oxford, 1961, p. 218.