

## CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET LIPOCHIMIE

## X. ANALYSE DE TRIGLYCÉRIDES MIXTES

D. LEFORT, R. PERRON, A. POURCHEZ, C. MADELMONT ET J. PETIT

*Laboratoire de Lipochimie du C.N.R.S., Bellevue (France)*

(Reçu d'abord le 27 janvier 1965)

(Reçu enfin le 18 octobre 1965)

## INTRODUCTION

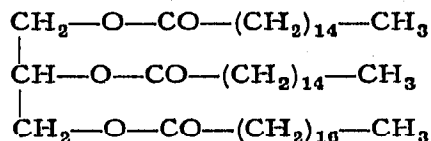
L'application de la chromatographie en phase gazeuse à l'étude des glycérides a conduit à des résultats suffisamment précis et certains pour que l'on puisse songer à aborder maintenant des problèmes plus délicats quant à la structure de ces composés.

En effet si les premiers essais dans ce domaine ont porté sur les mono- et diglycérides après acétylation des fonctions hydroxyle libres<sup>1</sup> ou sur les mono-glycérides sous forme d'esters allyliques<sup>2</sup>, plusieurs auteurs ont montré que les triglycérides pouvaient être analysés correctement par chromatographie en phase gazeuse. FRYER *et al.*<sup>3</sup> utilisant un taux d'imprégnation de 30 % de graisse de Silicone ont publié des chromatogrammes significatifs mais dont le tracé laissait penser que l'on pouvait obtenir mieux. En diminuant le taux d'imprégnation (0.75 %) PELICK *et al.*<sup>4</sup> analysaient un mélange de triglycérides du trilauride au tristéaride en 40 minutes. Les uns et les autres constataient d'ailleurs que les phases stationnaires Polyesters ou Apiezon ne donnaient pas de bons résultats.

Simultanément, HUEBNER<sup>5</sup> et KUKSIS ET MCCARTHY<sup>6</sup> amélioraient les séparations par l'utilisation de la programmation de température permettant ainsi d'analyser un mélange de triglycérides simples de la triacétine au tristéaride en des temps raisonnables (20 à 40 min). Les températures pratiquées relativement élevées (300 à 350° pour le tristéaride) pouvaient faire craindre une décomposition des triglycérides sur la colonne; en fait le tracé des chromatogrammes et l'étude par Infra-Rouge des produits piégés à la sortie de la colonne autorisent les précédents auteurs à dire qu'il n'en est rien. Bien entendu après l'étude qualitative de mélanges synthétiques de triglycérides simples la méthode fut appliquée à l'analyse des huiles naturelles<sup>5,6</sup> et même d'un point de vue quantitatif à la détection des fraudes dans le beurre<sup>7,8</sup>. Dans les chromatogrammes des produits naturels on observe, certes, les pics correspondant aux triglycérides simples mais également d'autres pics auxquels les auteurs ont accordé, par interpolation, des structures brutes de triglycérides mixtes sans que ceux-ci aient pu être comparés avec des échantillons authentiques.

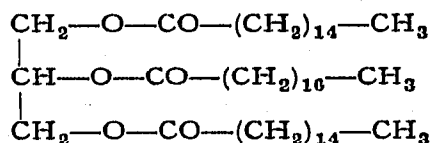
Dans le cadre d'une étude en analyse thermique différentielle effectuée sur les triglycérides, certains triglycérides mixtes ont été synthétisés, et pour vérifier la pureté des produits, nous en avons fait l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie en couche mince.

Pour simplifier l'écriture nous désignerons, par exemple, l' $\alpha,\beta$ -dipalmityl- $\alpha'$ -stéaride soit :



par le sigle PPS ;

l' $\alpha,\alpha'$ -dipalmityl- $\beta$ -stéaride soit :



par le sigle PSP et bien entendu les glycérides simples trimyristide, tripalmitide, tristéaride respectivement par les sigles  $M_3$ ,  $P_3$  et  $S_3$ , et ainsi de suite en désignant toujours par les lettres P, M et S les radicaux acyle correspondant respectivement aux acides palmitique, myristique et stéarique. Nous avons eu à étudier deux séries de triglycérides mixtes à deux termes homologues d'acides différents : acides palmitique et stéarique d'une part (soit SPP, PSP, PSS et SPS), acides palmitique et myristique d'autre part (soit de la même façon MPP, PMP, PMM et MPM).

Ces triglycérides ont été préparés de deux façons différentes :

Méthode A. Réaction d'un monoglycéride ou d'un diglycéride sur un acide gras adéquat en solution dans le chloroforme, à ébullition, en présence de quantités catalytiques d'acide *p*-toluènesulfonique.

Méthode B. Réaction d'un monoglycéride ou d'un diglycéride sur un chlorure d'acide gras convenable, en milieu chloroformique et en présence de pyridine à l'ébullition.

En outre, les triglycérides homogènes  $M_3$ ,  $P_3$  et  $S_3$  ont été préparés par action directe des acides gras correspondants sur le glycérol également en milieu chloroformique à l'ébullition, et en présence d'acide *p*-toluènesulfonique comme catalyseur.

Les deux méthodes A et B appliquées aux triglycérides mixtes, ont conduit à des résultats très différents comme nous allons le voir.

#### TRIGLYCÉRIDES SYNTHÉTISÉS PAR LA MÉTHODE A

D'une façon générale les chromatogrammes des glycérides obtenus par cette méthode, présentent tous plusieurs pics.

##### *Triglycérides d'acides stéarique et palmitique*

Le chromatogramme d'un mélange de glycérides simples ( $M_3 + P_3 + S_3$ ) donne un seul pic pour chacun des constituants, parfaitement symétrique et séparé des voisins comme le montre la Fig. 1, alors que celui d'un glycéride mixte (SPS, PSS, PPS ou PSP) est toujours constitué de trois ou quatre pics proches les uns des autres et d'importances relatives variables selon les échantillons. Par interpolation, d'après les températures d'éluion comparées à celles d'un mélange témoin ( $M_3 + P_3 + S_3$ )

analysé dans les mêmes conditions on est en droit de supposer que le glycéride PSS, par exemple, obtenu par cette méthode de synthèse, est en fait un mélange de  $P_3$  ( $308^\circ$ ),  $P_2S$  ( $318^\circ$ ),  $PS_2$  ( $327^\circ$ ) et  $S_3$  ( $334^\circ$ ) (Fig. 2).

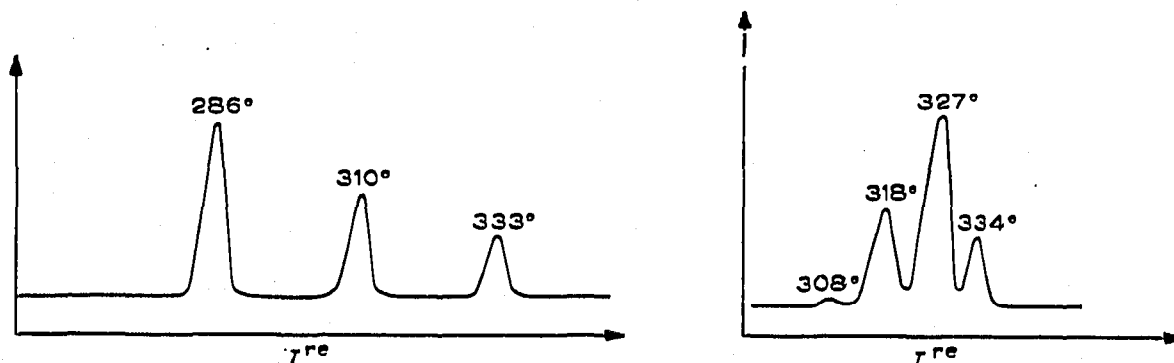


Fig. 1. Mélange de glycérides simples  $M_3-P_3-S_3$ . Colonne 50 cm; Silicone SE 52 — 4% sur Chromosorb 60/80 traité HMDS. Température programmée:  $4^\circ$  par minute.

Fig. 2. Glycéride mixte PSS préparé selon méthode A. Colonne 50 cm; Silicone SE 52 — 4% sur Chromosorb 60/80 traité HMDS. Température programmée:  $4^\circ$  par minute.

Toutefois, il peut être objecté également que le produit injecté était pur mais qu'il a subi au contact de la colonne et sous l'influence de la température des réarrangements intermoléculaires conduisant à divers glycérides.

Nous nous sommes efforcés de démontrer que précisément il n'y avait pas réarrangements et que les différents pics représentaient bien les glycérides correspondants, présents dans le produit initial. D'ailleurs la seconde méthode de synthèse a confirmé ce résultat puisqu'elle conduit, comme nous le verrons, à un produit pur ne donnant qu'un seul pic.

Nous avons travaillé sur un échantillon de  $SP_2$  dont le chromatogramme comporte trois pics (Fig. 3) et les arguments prouvant qu'il s'agit d'un mélange sont

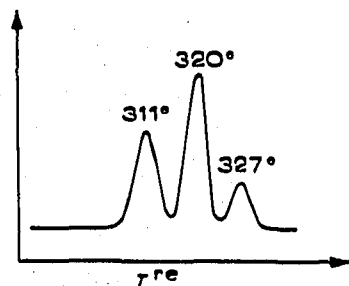


Fig. 3. Glycéride mixte PPS préparé selon méthode A. Colonne 50 cm; Silicone SE 52 — 4% sur Chromosorb 60/80 traité HMDS. Température programmée:  $4^\circ$  par minute.

également valables pour les autres glycérides mixtes. Ces arguments sont les suivants:

(1) Un mélange des trois glycérides simples  $M_3$ ,  $P_3$  et  $S_3$  donne trois pics parfaitement symétriques et de géométrie irréprochable. L'absence rigoureuse de pics parasites intermédiaires prouve qu'il n'y a pas d'échanges intermoléculaires. Dès lors nous voyons mal pourquoi ces échanges auraient lieu quand il s'agit de molécules de glycérides mixtes et non dans le cas de glycérides simples.

(2) En admettant que ces échanges existent et que la colonne en soit la cause, si nous faisons varier le temps de contact, en affichant une température initiale plus ou moins élevée et en opérant à une vitesse de programmation plus ou moins grande, nous devrions observer des modifications dans les proportions relatives des différents pics. Rien de tel ne se produit et, aux erreurs d'expériences près (de l'ordre de 5 %), les surfaces respectives sont équivalentes d'une expérience à l'autre comme le montre le Tableau I.

TABLEAU I

Gaz vecteur: Azote 47.5 ml/min. Temp. injecteur: 325°.

<i>T° départ</i>	<i>Progr.</i>	<i>Temp. élution des 3 pics</i>			<i>% Calculé par triangu- lation</i>			<i>Temps d'élution des 3 pics</i>		
200°	+4°	310	319	325	35.7	54.2	10.1	30'10"	32'32"	34'12"
200°	+3°	302	310.5	318	38	54.3	7.7	39'03"	42'22"	44'37"
225°	+4°	308	317.5	324	32	55	13	22'36"	24'05"	26'52"
225°	+3°	301	310	317	34.3	53.7	12	28'59"	32'18"	34'33"
225°	+2°	294	302	315	38	52.5	9.5	38'13"	44'08"	47'27"
250°	+4°	306	315	321.5	34.7	50.8	14.5	15'44"	18'06"	19'46"
250°	+3°	300	309	315	32.4	53.1	14.5	19'39"	22'50"	25'05"
250°	+2°	294	301	308	34.7	54	11.3	24'30"	28'45"	32'11"
275°	+4°	307.5	315	321	32.1	51.6	16.3	8'45"	10'46"	12'25"
275°	+3°	301	309	315	30.3	53.7	10	10'32"	13'22"	15'30"
275°	+2°	296	302.5	308	30.6	53.6	15.8	12'04"	15'44"	18'42"
275°	+1°	288	293.5	298	31.4	52.9	15.7	15'02"	20'57"	25'48"

(3) Les spectres I.R. du produit de départ et du produit récupéré en totalité à la sortie de la colonne, effectués en solution à même concentration, sont identiques qualitativement et quantitativement à l'exception d'une légère altération, dans le spectre du produit récupéré vers  $1710\text{ cm}^{-1}$ . On observe d'ailleurs la même altération, insignifiante dans le spectre d'un glycéride simple, pur, récupéré après chromatographie.

(4) Le chromatogramme du glycéride  $\text{SP}_2$  comporte trois pics (Fig. 3) dont nous avons attribué l'origine, dans l'ordre, aux glycérides  $\text{P}_3$  ( $311^\circ$ ),  $\text{SP}_2$  ( $320^\circ$ ),  $\text{S}_2\text{P}$  ( $327^\circ$ ); chacun de ces pics a été "piégé" à la sortie de la colonne, opération délicate étant donné la résolution relativement faible et la quantité de substance injectée réduite et qui a demandé des chromatographies répétées.

Chacun des produits ainsi récupérés a été identifié de la façon suivante:

(a) Nouvelle chromatographie en phase gazeuse: on obtient alors un seul pic élué à la température initialement observée dans le chromatogramme du produit de départ.

(b) Transformation des acides gras constitutifs des glycérides en esters méthyliques et détermination quantitative de la composition du mélange ainsi obtenu. Les résultats rassemblés dans le Tableau II, compte tenu du fait que la proximité des pics sur le chromatogramme du glycéride  $\text{SP}_2$  ne permet pas une récupération excluant rigoureusement les produits voisins, confirment qu'il s'agit bien de la structure assignée d'après la température d'élution.

Nous pensons ainsi avoir démontré qu'un glycéride mixte préparé par la mé-

TABLEAU II

Désignation du pic	Temp. d'élu- tion (°C)	Composition % en esters méthyliques				
		Trouvé		Calculé		
		Palmitique	Stéarique	Palmitique	Stéarique	
No. 1	P <sub>3</sub>	311	91	9	110.5	0
No. 2	SP <sub>2</sub>	320	61	39	64.5	35.5
No. 3	S <sub>2</sub> P	327	38	62	31.2	68.8

thode A était en fait un mélange de plusieurs glycérides, que les divers pics obtenus par chromatographie en phase gazeuse correspondaient à des glycérides existant dans le produit final et n'étaient pas la conséquence d'échanges intermoléculaires sur la colonne.

#### *Triglycérides mixtes d'acides palmitique et myristique*

D'une façon similaire la chromatographie en phase gazeuse révèle que les produits PMM, MPM, MPP et PMP sont également des mélanges de glycérides; par exemple le composé auquel le processus de synthèse pourrait à première vue attribuer la structure PMM est en fait constitué de M<sub>3</sub> (297°), M<sub>2</sub>P (302°), MP<sub>2</sub> (308°) et P<sub>3</sub> (314°).

Ces résultats ont pour seul but de montrer que la méthode de synthèse utilisée

(309°) et du tristéaride (319°) pour des conditions opératoires de colonne et de programmation de températures identiques bien entendu.

La séparation des glycérides  $P_3$ ,  $SP_2$ ,  $S_2P$  et  $S_3$  est relativement aisée (Fig. 4) et apporte ainsi une première preuve du bien fondé des suppositions faites par divers auteurs dans l'interprétation des chromatogrammes de glycérides d'huiles naturelles.

#### CONFIRMATION DES RÉSULTATS PAR CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES

Les différents composés ont été testés par la méthode de KAUFMAN *et al.*<sup>9</sup>. Cette méthode, d'emploi très différent n'a pu être valablement exploitée que dans le cas des triglycérides d'acides myristique et palmitique.

Les chromatogrammes obtenus sont représentés Fig. 5.

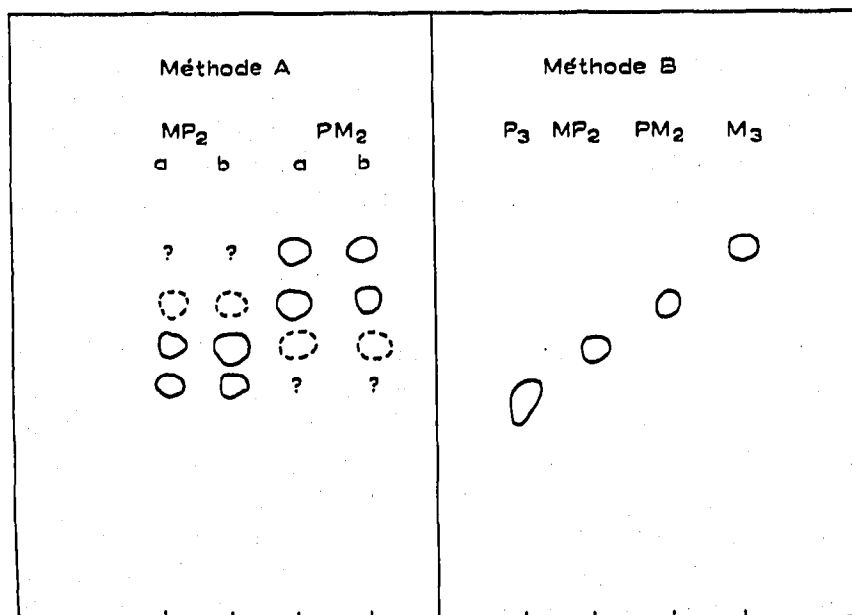


Fig. 5. Chromatographie en couche mince selon KAUFMANN *et al.*<sup>9</sup> des triglycérides dérivant des acides myristique et palmitique préparés par les méthodes A et B.

Les chromatogrammes de la partie gauche de cette figure se rapportent aux produits résultant de la méthode A, les désignations a et b indiquant que la synthèse a été faite respectivement à partir d'un mono ou d'un diglycéride.

Ces chromatogrammes montrent clairement que la méthode A conduit bien à un mélange de triglycérides, et confirment les résultats de la chromatographie gazeuse.

Dans la partie droite de la Fig. 5, les composés  $MP_2$  et  $PM_2$  préparés selon la méthode B, et les deux triglycérides homogènes  $M_3$  et  $P_3$ , servant de témoins pour les chromatogrammes de la partie gauche, ne donnent effectivement qu'un seul spot, confirmant la pureté des produits obtenus par cette méthode.

#### CONCLUSIONS

La chromatographie en phase gazeuse et, conjointement, la chromatographie en couche mince, ont permis de montrer d'une façon certaine que la méthode A de

synthèse (glycéride partiel + acide gras, en présence d'acide *p*-toluènesulfonique) conduisait à des glycérides mixtes qui en fait se trouvent être des mélanges de divers glycérides mixtes et simples alors que la méthode B (glycéride partiel + chlorure d'acide en présence de pyridine) permet d'obtenir les produits purs attendus, et par déduction de confirmer le fait que l'acide *p*-toluènesulfonique est un excellent catalyseur de transestérification.

D'autre part la chromatographie en phase gazeuse permet de séparer et de caractériser des triglycérides dont le nombre total d'atomes de carbone diffère de deux unités.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### *Synthèse des glycérides*

Avant d'appliquer les méthodes A ou B aux mono- et diglycérides convenables, nous avons préparé ceux-ci selon les procédés suivants :

Dans le premier cas (monoglycérides), et selon HARTMAN<sup>10</sup>, en formant d'abord l'isopropylidène-glycérol en présence d'acide *p*-toluènesulfonique dans le chloroforme, puis en faisant réagir l'acide gras approprié sur ce composé, et en hydrolysant ensuite après formation d'un complexe de l'acide borique introduit dans le méthoxy-2 éthanol.

Les produits bruts ont été recristallisés plusieurs fois et successivement, dans l'éthanol et l'acétone.

Dans le second cas ( $\alpha,\alpha'$ -diglycéride), en faisant agir sur le glycérol, le chlorure d'acide correspondant, en milieu chloroformique, et en présence de pyridine et de N-diméthylformamide, selon HARTMAN<sup>11</sup>. Les produits bruts ont été recristallisés successivement dans l'éthanol et l'hexane.

Méthode A. Nous avons fait réagir, en transposant la méthode de HARTMAN<sup>10</sup> citée plus haut, les acides gras purs sur les mono- et diglycérides préparés précédemment, en milieu chloroformique, à l'ébullition, en présence d'acide *p*-toluènesulfonique, l'eau de la réaction ayant été éliminée par passage des vapeurs chloroformiques sur carbonate de potassium anhydre.

Les triglycérides homogènes ont été avantageusement synthétisés par le même procédé.

Méthode B. Les différents glycérides mixtes purs ont été préparés selon CRAIG *et al.*<sup>12</sup>, en faisant agir le chlorure d'acide convenable sur les mono- ou diglycérides, en milieu chloroformique et en présence de pyridine, à reflux. Cristallisation des produits dans l'éthanol et l'acétone.

Les caractéristiques des divers produits préparés, tels les points de fusion ou de solidification, sont données dans une autre publication.

### *Chromatographie en phase gazeuse*

Les chromatogrammes analytiques ont été réalisés avec un appareil Aérograph Hy-Fi A-600 à détecteur ionisation de flamme, muni d'un programmeur de température, dans les conditions suivantes :

Colonne: 50 cm  $\times$  0.2 cm; Chromosorb 60/80 traité HMDS. Silicone SE52 — 4%; Gaz vecteur: Azote 60 cm<sup>3</sup>/min; Température injecteur: 350°; Température colonne: de 260° à 340°.

Les récupérations d'échantillon ont été faites sur un appareil Aérograph A 90 S, à détecteur catharomètre, dans les conditions suivantes :

Colonne: 50 cm × 0.45 cm; Chromosorb 60/80 traité HMDS. Silicone SE 52 — 15 %; Gaz vecteur: Hydrogène; Température injecteur: 350°; Température colonne: 320°.

#### *Spectres I.R.*

Les spectres I.R. ont été effectués en solution dans le tétrachlorure de carbone, avec un appareil Beckman IR-5.

#### *Chromatographie en couches minces*

(1) La pureté de tous les produits préparés, quant à leur identité de mono-, di- ou triglycéride, a été contrôlée selon la technique préconisée par PRIVETT *et al.*<sup>13</sup>.

(2) Les produits MP<sub>2</sub>, PM<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> et M<sub>3</sub> provenant des méthodes A et B, ont été chromatographiés selon KAUFMANN *et al.*<sup>9</sup>, utilisant comme support du Kieselguhr G imprégné de tétradécane, et en éluant par le mélange acétonitrile-acétone (20:80) saturé à 80 % de tétradécane.

Les mêmes conditions appliquées aux glycérides dérivés des acides palmitique et stéarique, n'ont pas permis de bonnes séparations.

#### RÉSUMÉ

La chromatographie en phase gazeuse permet d'identifier et donc de vérifier la pureté, des divers glycérides mixtes d'acides myristique, palmitique et stéarique sans qu'il soit possible toutefois de différencier les isomères de position. Les auteurs ont démontré qu'un glycéride mixte ne subissait pas de modification au cours de l'opération.

#### SUMMARY

By means of gas chromatography it is possible to identify and verify the purity of various mixed glycerides of myristic, palmitic and stearic acid. Positional isomers can, however, not be differentiated. It is shown that a mixed glyceride does not undergo transformation during the procedure.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 V. HUEBNER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 36 (1959) 262.
- 2 A. MCINNES, N. TATTRIE ET M. KATES, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 37 (1960) 7.
- 3 F. FRYER, W. ORMAND ET G. CRUMP, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 37 (1960) 589.
- 4 N. PELICK, W. SUPINA ET A. ROSE, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 506.
- 5 V. HUEBNER, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 628.
- 6 A. KUKSIS ET M. MCCARTHY, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 40 (1962) 679.
- 7 A. KUKSIS, M. MCCARTHY ET J. BEVERIDGE, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 40 (1963) 530.
- 8 A. KUKSIS ET M. MCCARTHY, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 41 (1964) 17.
- 9 H. KAUFMANN, Z. MAKUS ET B. DAS, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 63 (1961) 807.
- 10 L. HARTMAN, *Chem. Ind. (London)*, (1960) 711.
- 11 L. HARTMAN, *J. Chem. Soc.*, (1957) 3572.
- 12 B. CRAIG, W. LUNDBERG ET W. GEDDES, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 29 (1952) 169.
- 13 C. PRIVETT, M. BLANK ET W. LUNDBERG, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 312.