

CHROM. 12,668

Note

Séparation d'acides gras à très longue chaîne extraits d'une tourbe par chromatographie par perméation de gel

J. C. WILHELM et J. M. BLOCH

Laboratoire de Chimie Minérale et Analytique, Faculté des Sciences, Ile du Saulcy, 57000 Metz (France)

(Reçu le 10 janvier 1980)

Au cours de précédents travaux^{1,2}, nous avons porté notre attention sur les composés obtenus par extraction à l'éther éthylique d'une tourbe provenant d'Allemagne du Nord. Cet extrait étheré a été séparé par saponification en une fraction acide (77%) et une fraction insaponifiable (23%). L'étude par spectroscopie infrarouge et résonance magnétique nucléaire (RMN) montre qu'il s'agit de composés à longue chaîne. Par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse, nous avons identifié, dans la fraction acide, des acides gras linéaires de C₁₆ à C₃₄ et des acides gras ω -hydroxylés de C₁₆ à C₂₈. Ces composés représentent au total environ 35% de la fraction acide (estimation effectuée par chromatographie en phase gazeuse). D'autre part, nous avons séparé par chromatographie d'adsorption sur gel de silice plusieurs fractions dont les masses molaires moyennes en nombre, déterminées par tonométrie, s'échelonnent de 400 à 1300². Afin d'avoir une idée plus exacte de la répartition des masses molaires, nous avons entrepris une étude par chromatographie par perméation de gel (CPG), technique également utilisable pour la séparation par taille de petites molécules (mol.wt. < 2000)^{3,4}.

EXPERIMENTAL

Matériel

Chromatographe HPLC, Waters M 6000A; détection par réfractométrie différentielle; colonnes μ Styragel 500 Å et 100 Å en série, 30 cm \times 7.8 mm I.D.; solvants, benzène et tétrahydrofuranne (THF).

Étalonnage des colonnes

Pour étalonner le jeu de colonne choisi, nous avons chromatographié des hydrocarbures normaux de C₁₇ à C₄₀, des esters méthyliques d'acides gras de C₁₅ à C₃₀ ainsi que des triglycérides. Simultanément, avec chaque composé étudié, on a injecté un polystyrène standard de masse molaire 110,000 qui définit la limite d'exclusion V_0 du jeu de colonnes utilisé.

Les courbes d'étalonnage $\log n = f(V - V_0)$, où n est le nombre total d'atomes de carbones du composé chromatographié, sont représentées par les Fig. 1a et 1b, avec comme éluants respectivement le benzène et le THF. Dans les deux cas, les courbes correspondant aux hydrocarbures et aux esters méthyliques sont pratiquement

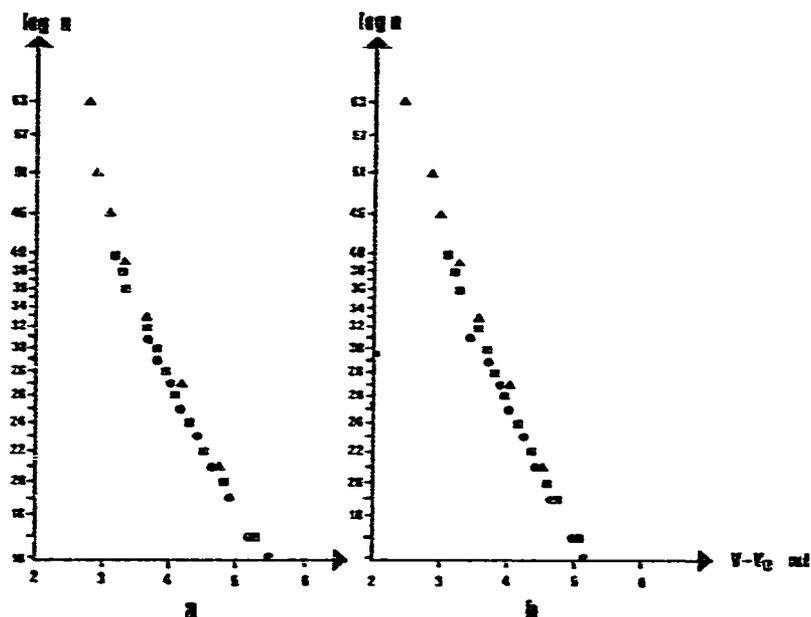


Fig. 1. Courbes d'étalonnage des colonnes μ Styragel en fonction de la longueur de chaîne: ■, *n*-alcanes; ●, esters méthyliques; ▲, triglycérides. Éluants: (a) benzène; (b) THF.

confondues. La courbe représentative des triglycérides se situe légèrement au-dessus des précédentes, c'est-à-dire qu'ils apparaissent un peu plus petits que les *n*-alcanes ou les esters méthyliques ayant même nombre total d'atomes de carbone.

En CPG, c'est la taille et non la masse molaire qui intervient dans le mécanisme de séparation. Ceci prend une importance toute particulière avec des molécules comprenant des groupements polaires, comme OH et COOH⁵. Ces molécules se comportent de façon opposée suivant la polarité de l'éluant utilisé. Avec le benzène comme éluant, des phénomènes d'adsorption se superposent au mécanisme d'exclusion pure. Cet effet est le plus sensible avec les molécules les plus polaires. Ainsi l'octadécanol sort comme l'hexadécane. L'utilisation du benzène pour chromatographier les acides gras libres est à déconseiller car les phénomènes d'adsorption se traduisent par des pics très retardés, larges et asymétriques. Lorsqu'on utilise au contraire un solvant polaire comme le THF, les phénomènes d'adsorption disparaissent, mais des liaisons hydrogène s'établissent entre les atomes d'hydrogène des groupements polaires et le solvant, ce qui a pour effet d'augmenter la taille des molécules: la taille apparente de l'octadécanol est celle d'un hydrocarbure en C₂₁ et l'acide stéarique apparaît comme l'hydrocarbure en C₂₂. Néanmoins, lorsque la longueur de la chaîne augmente, l'influence de ces liaisons diminue: la longueur de chaîne apparente de l'acide tétracosanoïque ($n = 24$) est de 26.5. D'autre part, l'étude de divers diglycérides montre qu'au delà de $n = 30$, les différences introduites par la présence d'hydroxyles deviennent peu sensibles et sont du même ordre de grandeur que les incertitudes expérimentales.

A l'opposé, les composés comportant une ou plusieurs doubles liaisons présentent une structure plus compacte: le trioléate de glycérol se comporte comme le tripalmitate de glycérol, le cholestérol apparaît comme un hydrocarbure en C₁₉.

Ces diverses observations montrent la prudence qu'il faut apporter dans l'exploitation des chromatogrammes de composés dont on ne connaît pas tous les éléments structuraux. On peut néanmoins raisonner en terme de longueur de chaîne équivalente.

RESULTATS

La Fig. 2a représente le chromatogramme de la fraction acide de l'extrait de tourbe (éluant THF). On distingue un pic large A dont le sommet correspond à une longueur de chaîne équivalente de $n = 55-75$ et un massif B correspondant à des molécules plus petites: $n = 15-34$. Le chromatogramme obtenu après méthylation des carboxyles se traduit par une petite diminution de n équivalent de 2-3 unités pour les pics du massif B (disparition des associations entre les carboxyles et le solvant). Par contre, on n'observe pas de variation significative du volume d'éluion de A en raison de la taille plus importante des molécules. Avec le benzène comme

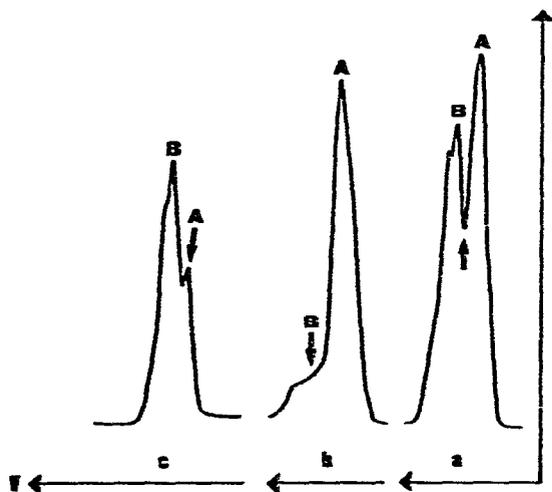


Fig. 2. Séparation de l'extrait de tourbe par CPG. (a) Mélange initial; (b) fraction A après séparation de B; (c) fraction B après trois séparations.

éluant, le chromatogramme de la fraction acide méthylée révèle les mêmes pics A et B dont les longueurs de chaîne équivalentes correspondent aux précédentes. Il résulte de cette étude que la fraction acide de l'extrait de tourbe contient des composés de deux tailles différentes: un premier groupe de molécules relativement petites dont la longueur de chaîne varie de 15-34 et un deuxième groupe de molécules approximativement de longueur double ($n = 55-75$). L'étude par CPG des différentes fractions que nous avons séparées précédemment² par chromatographie classique sur gel de silice, montre qu'on a également affaire en réalité à des mélanges de composés de tailles A et B.

La Fig. 2a montre que les pics A et B sont partiellement résolus. Un deuxième passage de ces composés sur les colonnes par recyclage des composés élués se traduit

par un élargissement des pics sans amélioration appréciable de la séparation. Les recyclages supplémentaires accroissent cet élargissement et il en résulte que la séparation des pics en ligne de base n'est pas possible de cette façon. Nous avons préféré collecter les produits A et B puis les rechromatographier. La flèche sur la Fig. 2a indique la fin de la collecte de A et le début de celle de B. La fraction A ainsi obtenue est pratiquement exempte de B (Fig. 2b), par contre la fraction B contient encore des molécules de type A. Une deuxième puis une troisième chromatographie de B permettent d'améliorer cette séparation (Fig. 2c). On obtient de cette façon des fractions A et B pratiquement séparées. Le tableau donne leurs proportions en poids après chacune des trois séparations.

TABLEAU I

PROPORTIONS DES FRACTIONS A ET B EN POIDS APRÈS CHACUNE DES TROIS SÉPARATIONS

| Nombre de séparations | Fraction (%) | |
|-----------------------|--------------|------|
| | A | B |
| 1 | 30.3 | 69.7 |
| 2 | 36.7 | 63.3 |
| 3 | 39.5 | 60.5 |

CONCLUSION

Par chromatographie d'exclusion, nous avons donc déterminé dans la fraction acide d'une cire extraite d'une tourbe deux tailles de composés: A (mol. wt., 800–1100) et B (mol. wt. 250–500) dont les proportions respectives sont d'environ 40 et 60%. Dans la fraction B on retrouve les acides gras normaux et les acides gras hydroxylés précédemment identifiés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse ($n = 16-34$)². Ces acides gras représentant 35% du produit initial, il reste dans la fraction B 25% de composés relativement petits ($n < 35$), mais pourtant difficiles à mettre en évidence par chromatographie en phase gazeuse. Nous espérons néanmoins trouver les conditions adéquates pour leur séparation et leur identification.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. C. Wilhelm, *Thèse de 3ème cycle*, Faculté des Sciences de Metz, mars 1974.
- 2 J. C. Wilhelm et J. M. Bloch, *Analisis*, 5 (1977) 135–143.
- 3 K. J. Bombaugh, W. A. Dark et R. F. Levangie, *J. Chromatogr. Sci.*, 7 (1969) 43–47.
- 4 G. Seroussi, *Actual Chim. S.C.F.*, 10 (1974) 23–25.
- 5 G. Seroussi et T. van de Put, *En chromatographie par perméation de gel: c'est la taille et non le poids qui fait la différence*, Communication No. 58, Waters Assoc., Paris, 1976, pp. 1–5.