

## ETUDE DES HYDROXYACIDES DES CIRES DE POMME ET DE CARNAUBA

P. MAZLIAK

Laboratoire de Biologie Végétale du CNRS, Bellevue (S et O), France

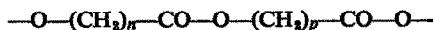
(Received 1 January 1963)

**Résumé**—Les hydroxyacides des deux cires séparés des acides normaux sur une colonne de trisilicate de magnésium, sont chromatographiés sous forme d'acetoxyesters méthyliques. Les constituants à nombre pair et impair d'atomes de carbone de  $C_{10}$  à  $C_{30}$  sont ainsi décelés dans la cire de Carnauba; la cire de pommes contient les hydroxyacides pairs et impairs de  $C_{10}$  à  $C_{22}$ .

**Abstract**—The hydroxyacids from both carnauba and apple waxes, were separated from the normal acids on a magnesium silicate column, and examined by gas chromatography as methyl acetoxy esters. Carnauba wax was shown to contain constituents with both odd and even numbers of carbon atoms from  $C_{10}$  to  $C_{30}$ , and apple wax contained similar components from  $C_{10}$  to  $C_{22}$ .

LES hydroxyacides découverts jusqu'à présent dans les cires des végétaux supérieurs<sup>1</sup> sont des constituants à longue chaîne moléculaire, présentant un groupement fonctionnel acide à une extrémité de la chaîne et un groupement alcool primaire à l'autre extrémité. Ce sont donc des  $\omega$ -hydroxyacides de formule générale  $\text{HO}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ .

Les travaux déjà anciens de Bougault et Bourdier<sup>2</sup> ont montré que les cires des conifères (*Juniperus*, *Picea*, *Pinus*, *Thuja*) renferment en forte proportion (80 pour cent) les deux hydroxyacides suivants : l'acide junipérique (16-hydroxyhexadécanoïque) et l'acide sabinique (12-hydroxydodécanoïque). Dans les cires naturelles, ces corps sont polymérisés en longues chaînes ; une fonction acide d'un constituant estérifie la fonction alcool du suivant selon le schéma :



Bougault et Bourdier<sup>2</sup> ont nommé "estolides" ou "étholides" ces polymères lipidiques de type nouveau, par analogie avec les saccharides ou les peptides.

Les cires d'Angiospermes sont beaucoup moins riches en hydroxyacides. Cependant Murray et Schoenfeld,<sup>3</sup> en 1955, ont montré que la cire du palmier brésilien *Copernicia cerifera* (plus connue sous le nom commercial de cire de Carnauba) contient cette catégorie de constituants. Par distillation fractionnée sous pression réduite des dérivés acétylés, ces auteurs ont identifié dans la cire de Carnauba tous les  $\omega$ -hydroxyacides normaux, à nombre pair d'atomes de carbone, de  $C_{18}$  à  $C_{30}$ .

En 1961, Downing, Krantz et Murray<sup>4</sup> ont repris l'étude des constituants de la cire de Carnauba par chromatographie en phase gazeuse. Ils ont complété les résultats des auteurs précédents en isolant notamment des traces d'hydroxyacides à nombre impair d'atomes de carbone, de  $C_{21}$  à  $C_{31}$ , et en ajoutant les hydroxyacides pairs en  $C_{32}$  et  $C_{34}$  à la liste des constituants précédemment établie.

Poursuivant notre étude de la composition chimique des cires de pommes<sup>5</sup> nous avons abordé l'analyse des hydroxyacides présents dans la cire solide cuticulaire en employant aussi la chromatographie en phase gazeuse. Cependant nous n'avons pas choisi le même

<sup>1</sup> D. T. DOWNING, *Rev. Pure and Appl. Chem.* **11**, 196 (1961).

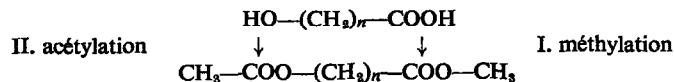
<sup>2</sup> J. BOUGAULT ET L. BOURDIER, *Compt. Rend.* **147**, 1311 (1909).

<sup>3</sup> K. E. MURRAY ET R. SCHOENFELD, *Australian J. Chem.* **8**, 437 (1955).

<sup>4</sup> D. T. DOWNING, Z. H. KRANTZ ET K. E. MURRAY, *Australian J. Chem.* **14**, 619 (1961).

<sup>5</sup> P. MAZLIAK, *Phytochemistry* **1**, 79 (1962).

type de dérivé volatil que les auteurs australiens. Ceux-ci transformaient les hydroxyacides par réduction, successivement en diols, puis en *hydrocarbures* (par l'intermédiaire des diiodides de diols); nous avons de notre côté transformé les hydroxyacides d'abord en esters méthyliques puis en *acétoxyesters méthyliques*, en acétylant secondairement la fonction alcool primaire, selon le schéma:



Ces acétoxyesters sont suffisamment volatils pour donner de beaux pics sur les chromatogrammes. L'identification de ces pics présente néanmoins quelques difficultés parce qu'il est impossible de trouver dans le commerce les hydroxyacides témoins nécessaires à l'étalonnage des systèmes chromatographiques.

Nous avons pris comme références deux mélanges d'hydroxyacides naturels déjà étudiés par d'autres auteurs. Il s'agit:(1) du mélange des deux hydroxyacides que Kirrmann et Duhamel<sup>6</sup> ont isolé à partir de l' "acide phellonique" brut du liège.<sup>7</sup> (2) du mélange des hydroxyacides naturels de la cire de Carnauba, étudiés par les chercheurs australiens cités plus haut.<sup>3,4</sup>

Nous avons pu ainsi retrouver, par une méthode nouvelle, les résultats de Downing *et al.*, puis étalonner nos systèmes chromatographiques pour l'analyse des hydroxyacides de la cire de pommes où cette catégorie de constituants n'avait jamais été étudiée.

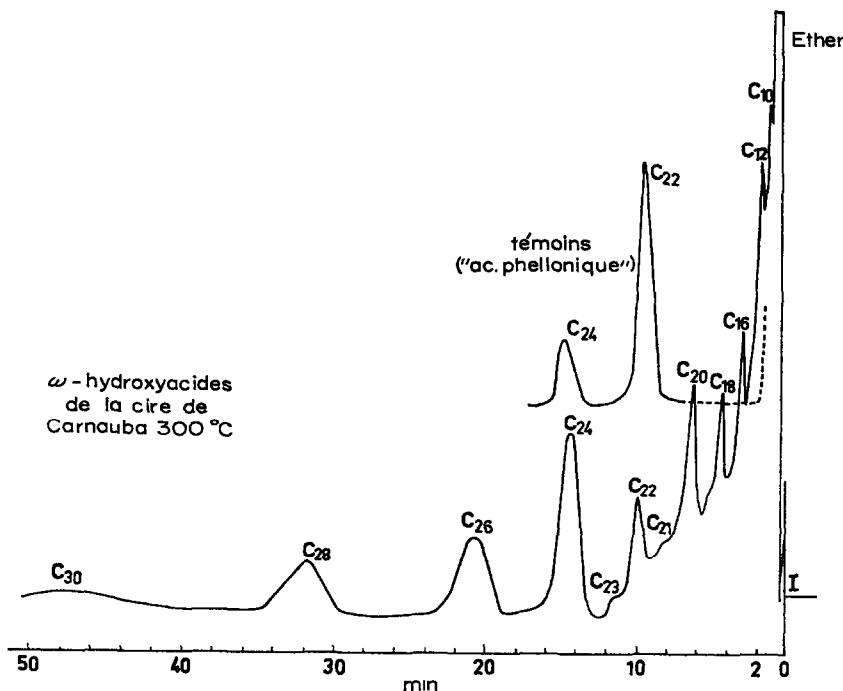


FIG. 1. CHROMATOGRAMMES DES DÉRIVÉS (ACÉTOXYESTERS) DE L'ACIDE PHELLONIQUE BRUT (EN HAUT) ET DES HYDROXYACIDES DE LA CIRE DE CARNAUBA (EN BAS). (I = INJECTION.)

<sup>6</sup> A. KIRRMANN et L. DUHAMEL, *Compt. Rend.* **254**, 1303 (1962).

<sup>7</sup> Nous remercions Mme DUHAMEL (Laboratoire de Chimie Organique de l'E.N.S.) et M. LEFORT (Laboratoire de Lipochimie du CNRS) qui nous ont procuré l'"acide phellonique" brut.

Les hydroxyacides des deux cires ont été séparés des acides normaux par chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium, à 50°C, après saponification de la cire brute puis méthylation.

#### *Les Hydroxyacides de la Cire de Carnauba*

La partie supérieure de la Fig. 1 montre un chromatogramme, obtenu à 300°C, sur colonne de silicone, de l'acide "phellonique" brut du liège. Comme Kirrmann et Duhamel<sup>6</sup> nous trouvons deux constituants pour ce corps brut; ces auteurs ont montré, à l'aide de témoins synthétisés au laboratoire, qu'il s'agit des acides 22-hydroxydocosanoïque et 24-hydroxytétracosanoïque, formant respectivement 80 et 20 pour cent du produit brut.<sup>7</sup> En bon accord avec ces résultats la surface du deuxième pic est égale au quart de la surface du premier pic sur notre chromatogramme.

Ces premiers résultats nous permettent de déterminer graphiquement les volumes de rétention théoriques de tous les hydroxyacides de  $C_{12}$  à  $C_{34}$  par exemple, chromatographiés dans les mêmes conditions (sous forme d'acétoxyesters). Il suffit pour cela d'appliquer la formule de James et Martin<sup>8</sup> valable pour une série de corps homologues,  $\log V_R = k n$ , dans laquelle  $n$  est le nombre d'atomes de carbone du constituant présentant le volume de rétention  $V_R$ , et  $k$  une constante de proportionnalité. Les deux valeurs obtenues avec les hydroxyacides permettent de tracer la droite donnant les logarithmes des volumes de rétention ( $\log V_R$ ) en fonction du nombre d'atomes de carbone. Les  $V_R$  sont calculés en unités arbitraires, le volume de rétention de l'acide 22-hydroxydocosanoïque étant pris comme unité (Fig. 2).

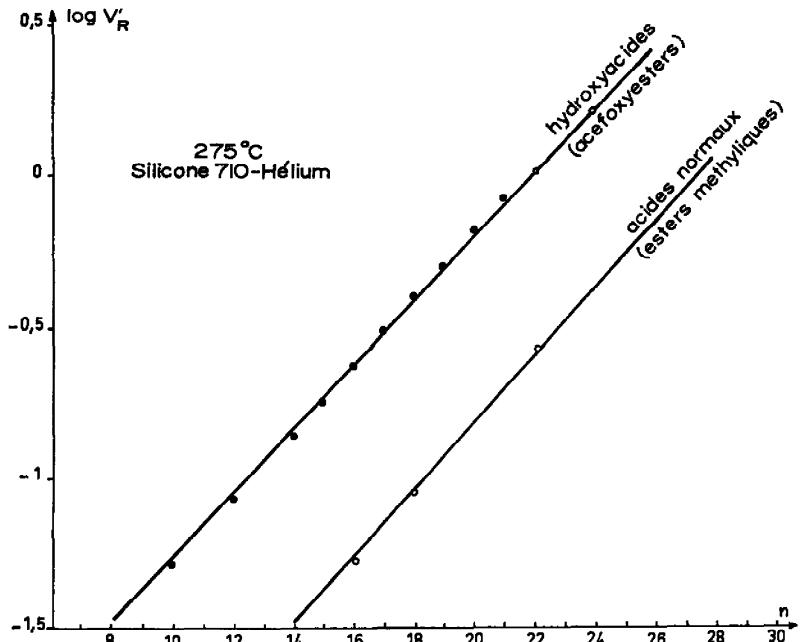


FIG. 2. DROITES D'ÉTALONNAGE DU SYSTÈME CHROMATOGRAPHIQUE SILICONE 710 HÉLIUM 275°C ( $V'_R$  = volume de rétention relatif, mesuré à partir du pic du solvant; l'unité choisie est le  $V'_R$  de l'acide 22-hydroxydocosanoïque).

○ valeurs obtenues avec les témoins.

● valeurs obtenues avec les constituants de la cire de pomme.

<sup>8</sup> A. T. JAMES and A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, **50**, 679 (1952).

La partie inférieure de la Fig. 1 présente le chromatogramme (obtenu à 300°C, sur colonne de silicone) des hydroxyacides de la cire de carnauba. Douze pics peuvent être dénombrés et on peut leur faire correspondre les hydroxyacides énumérés dans le tableau 1, par comparaison de leurs volumes de retention avec ceux des témoins ou avec les valeurs théorique calculées comme il est indiqué ci-dessus.

Nous retrouvons ainsi, dans la cire de Carnauba, tous les hydroxyacides que Downing *et al.* avaient précédemment découverts. La comparaison des pourcentages respectifs des divers constituants (tableau 1) établis dans les deux laboratoires est satisfaisante si l'on tient compte du fait que ce n'est pas le même échantillon qui a été analysé dans les deux cas.

TABLEAU 1. HYDROXYACIDES DE LA CIRE DE CARNAUBA

Nom systématique	Log $V'_R$ mesurés sur le chromatogramme*	Log $V'_R$ des témoins purs	Pourcentages calculés %	Pourcentages indiqués par Downing <i>et al.</i> %
10-hydroxydécanoïque	-1,14	-1,17	traces	
12-hydroxydodécanoïque	-0,92	-0,96	0,5	0,9
16-hydroxyhexadécanoïque	-0,62	-0,58	2,2	
18-hydroxyoctadécanoïque	-0,40	-0,39	4,5	1,5
20-hydroxyeicosanoïque	-0,203	-0,20	10,8	4,4
21-hydroxyheneicosanoïque	-0,09	-0,10	traces	0,5
22-hydroxydocosanoïque	0,00	0,00	7,8	6,2
23-hydroxytricosanoïque	0,08	0,08	0,5	0,8
24-hydroxytétracosanoïque	0,19	0,19	30,2	24,2
25-hydroxypentacosanoïque	—	—	—	1,1
26-hydroxyhexacosanoïque	0,38	0,38	20,8	22,2
27-hydroxyheptacosanoïque	—	—	—	0,8
28-hydroxyoctacosanoïque	0,58	0,58	12,9	30,9
29-hydroxynonacosanoïque	—	—	—	0,3
30-hydroxytriacontanoïque	0,76	0,76	9,5	4,4
31-hydroxyhentriacontanoïque	—	—	—	traces
32-hydroxydotriacontanoïque	—	—	—	1,6
34-hydroxytetracontanoïque	—	—	—	traces

\* à 300°.

#### Les Hydroxyacides de la Cire de Pomme

Nous avons d'abord essayé d'étudier les hydroxyacides de la cire de pomme (transformés en acétoxyesters) dans les mêmes conditions que celles employées pour la cire de Carnauba. Le résultat est présenté sur la partie gauche de la Fig. 3. Onze pics peuvent être dénombrés sur le chromatogramme mais il est immédiatement visible que les chaînes moléculaires des hydroxyacides de la cire de pomme sont beaucoup plus courtes que dans le cas précédent, ce qui explique la séparation insuffisante des divers constituants observée dans cette expérience. Les volumes de rétention de ces pics peuvent néanmoins être déterminés dans ces conditions et les hydroxyacides énumérés dans le tableau 2 correspondent aux volumes mesurés.

Nous avons obtenu une meilleure séparation des constituants dans une deuxième expérience effectuée à plus basse température (275°C); le chromatogramme obtenu dans ces nouvelles conditions est présenté à la partie droite de la Fig. 3 avec un chromatogramme des deux constituants de l' "acide phellonique". Quatorze pics cette fois sont visibles dont onze correspondent aux hydroxyacides énumérés dans le tableau 2. On remarque qu'à cette température relativement basse, un des constituants de la cire décelé à 300°C: l'acide 22-hydroxydocosanoïque, présent en faible quantité, n'apparaît déjà plus.

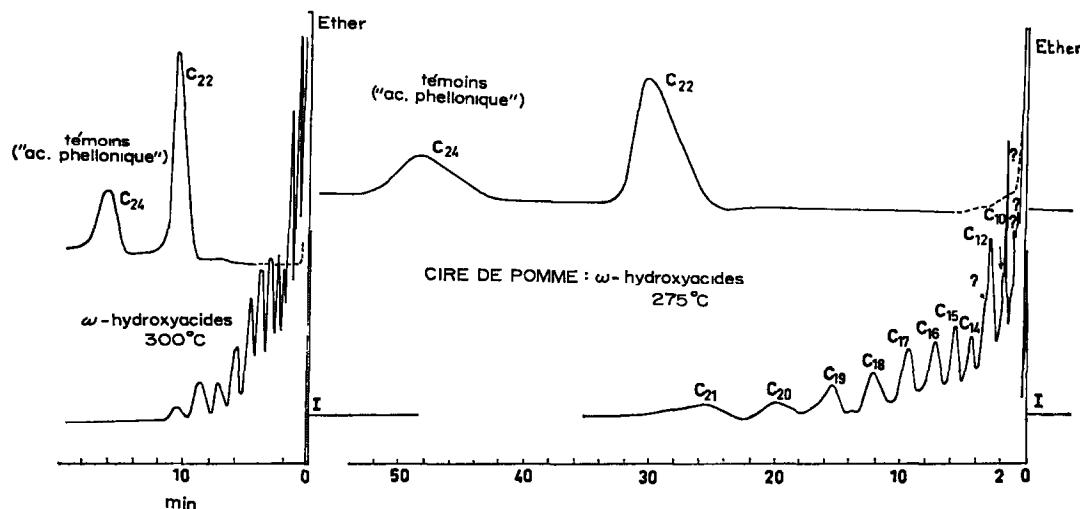


FIG. 3. CHROMATOGRAMMES OBTENUS A 300°C (À GAUCHE) PUIS A 275°C (À DROITÉ) DES DÉRIVÉS (ACÉTOXYESTERS) DE L'ACIDE PHELLONIQUE BRUT (EN HAUT) ET DES HYDROXYACIDES DE LA CIRE DE POMME (EN BAS). (I = INJECTION).

Les pourcentages approximatifs des divers hydroxyacides de la cire de pomme, calculés d'après les chromatogrammes, sont indiqués dans le tableau 2. Le calcul présente une certaine incertitude à cause de l'identification imprécise des premiers pics des chromatogrammes.

TABLEAU 2. HYDROXYACIDES DE LA CIRE DE POMME

Nom systématique	%	Chromatographie à 300°		Chromatographie à 275°	
		log $V'_E$ mesurés sur le chromato- gramme	log $V'_E$ des témoins purs	log $V'_E$ mesurés sur le chromato- gramme	log $V'_E$ des témoins purs
?	—	—	—	—	—
10-hydroxydécanoïque	4,3	-1,21	-1,17	-1,32	—
12-hydroxydodécanoïque	11,4	-0,95	-0,96	-1,28	-1,26
?	—	—	—	-1,07	-1,05
14-hydroxytétradécanoïque	4,3	-0,81	-0,79	-1,01	—
15-hydroxypentadécanoïque	8,9	-0,71	-0,68	-0,87	-0,85
16-hydroxyhexadécanoïque	10,0	-0,59	-0,58	-0,75	-0,74
17-hydroxyheptadécanoïque	10,7	-0,49	-0,48	-0,64	-0,64
18-hydroxyoctadécanoïque	11,0	-0,39	-0,39	-0,52	-0,52
19-hydroxynonadécanoïque	12,9	-0,29	-0,29	-0,41	-0,42
20-hydroxyeicosanoïque	7,7	-0,19	-0,20	-0,31	-0,31
21-hydroxyheneicosanoïque	13,3	-0,09	-0,10	-0,19	-0,21
22-hydroxydocosanoïque	5,3	0,00	0,00	-0,08	-0,10
				—	0,00

#### DISCUSSION

Compte tenu de la composition habituelle des cires végétales en hydroxyacides, nous avons assigné aux composés isolés de la cire de pomme la configuration  $\omega$ -hydroxylée. En toute rigueur il est possible, bien qu'improbable que les constituants isolés soient des hydroxyacides à fonction alcool secondaire ( $\text{CH}_3-\text{CHOH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$  par exemple) ou encore des hydroxyacides à chaîne ramifiée.

Les contrôles par spectrophotométrie que nous avons faits (voir Partie Expérimentale) nous ont permis de nous assurer que la fraction des acides normaux, élue en premier lieu, ne contenait pas d'hydroxyacides (Fig. 4). Par contre les contrôles effectués ne permettent pas d'affirmer que des acides normaux en faible quantité, ne sont pas présents dans nos fractions d'hydroxyacides. Certains des pics, non identifiés par exemple, pourraient donc représenter des acides normaux.

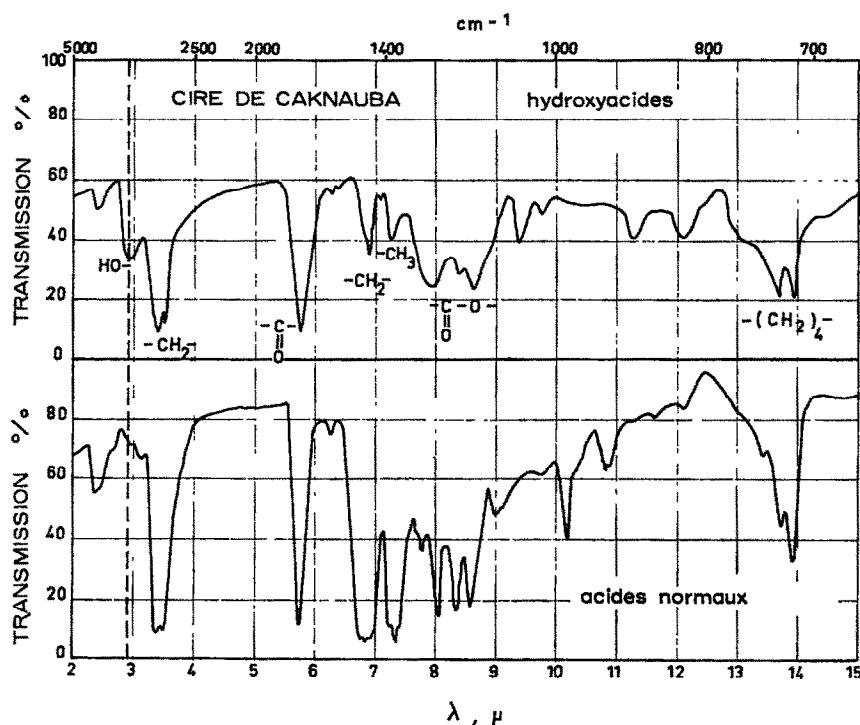


FIG. 4. SPECTRES INFRAROUGES DES ESTERS MÉTHYLTIQUES DES DEUX FRACTIONS ACIDES DE LA CIRE DE CARNAUBA SÉPARÉES SUR COLONNE DE TRISILICATE DE MAGNÉSIUM.

Il faut cependant remarquer qu'avec les conditions expérimentales utilisées, seuls les acides normaux à très longue chaîne pourraient avoir les temps de rétention observés.

La comparaison des deux catégories d'acides, présents dans chaque cire, permet d'ailleurs les observations suivantes.

Dans la cire de *Copernicia cerifera*, les deux catégories comprennent des corps renfermant de 16 à 34 atomes de carbone; pour les deux catégories ce sont les molécules à *nombre pair* d'atomes de carbone qui sont présentes en plus grand pourcentage (tableau 3); les acides ou les hydroxyacides "impairs" n'apparaissent qu'à l'état de traces.

Dans la cire de pomme, les répartitions sont différentes. Les acides normaux présentent des chaînes moléculaires (jusqu'en  $C_{30}$ )<sup>9</sup> plus longues que celles des hydroxyacides (tableau 3). De plus les acides normaux "impairs" n'apparaissent sur les chromatogrammes qu'à l'état de traces alors que les hydroxyacides impairs sont présents en pourcentages importants. Tous ces faits suggèrent des voies de biosynthèse différentes, dans les deux cires, pour les

<sup>9</sup> P. MAZLIAK, *Compt. Rend.* 250, 2255 (1960).

hydroxyacides; les composés pairs ne sont peut-être pas formés de la même façon que les composés impairs.

TABLEAU 3. ACIDES DES CIRES DE POMMES ET DE CARNAUBA

Nombre d'atomes de carbone	Cire de Carnauba*		Cire de pommes	
	acides normaux %	hydroxyacides %	acides normaux %	hydroxyacides %
10	—	—	—	4,3
12	—	—	—	11,4
14	—	—	traces	4,3
15	—	—	—	8,9
16	0,7	0,9	21,9	10,0
17	—	—	—	10,7
18	1,9	1,5	26,3†	11,0
19	—	—	—	12,9
20	9,1	4,4	8,7	7,7
21	0,3	0,5	—	13,3
22	9,8	6,2	8,8	5,3
23	1,0	0,8	—	—
24	28,4	24,4	5,4	—
25	1,0	1,1	traces	—
26	13,5	22,2	5,1	—
27	0,4	0,8	traces	—
28	21,2	30,9	9,1	—
29	0,3	0,3	traces	—
30	7,6	4,4	14,3	—
31	—	traces	—	—
32	3,1	1,6	—	—
33	—	—	—	—
34	1,7	traces	—	—

\* Données de Downing *et al.*<sup>4</sup>

† Ce pourcentage comprend une faible proportion d'acides insaturés.<sup>9</sup>

Il est intéressant enfin de remarquer que dans les membranes végétales où se dépose la cire, on peut trouver deux autres substances très riches en hydroxyacides: la cutine (Matic<sup>10</sup>) et le liège (Ribas-Marques).<sup>11</sup> Les constituants en sont des types variés: en plus des  $\omega$ -hydroxyacides, on y a isolé des polyhydroxyacides (possédant une ou plusieurs fonctions alcool secondaire), des hydroxydiacides, etc.

Dans les cires, les hydroxyacides ou les estolides sont libres, donc solubles dans les solvants organiques chauds. Dans la cutine ou le liège, par contre, à cause de la présence de corps polyhydroxylés, les chaînes polymérisées sont liées en réseau et par conséquent insolubles. Il est donc peu probable que l'extraction des cires entraîne des constituants de la cutine ou du liège. Une saponification est nécessaire pour libérer les hydroxyacides de ces deux substances membranaires.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

La cire de Carnauba analysée est le produit commercial fourni par les Etablissements Touzart et Matignon (Paris). La cire de pomme est extraite des cuticules selon la méthode Huelin et Gallop.<sup>12</sup>

<sup>10</sup> M. MATIC, *Biochem. J.* **63**, 168 (1956).

<sup>11</sup> I. RIBAS-MARQUES, *Chim. Ind. Paris* **68**, 333 (1952).

<sup>12</sup> H. E. HUELIN and R. A. GALLOP, *Australian J. Sci. Research* **4**, 526 (1951).

### *Saponification Prealable des Cires*

Deux grammes de cire sont saponifiés par 100 ml de potasse alcoolique (2N), à la température d'ébullition douce du mélange, sous réfrigérant à reflux. La saponification dure 8 hr, puis on ajoute 50 ml d'eau distillée à la liqueur: les sels alcalins des acides sont complètement dissous dans le milieu après deux heures d'ébullition.

On ajoute alors à la liqueur de saponification 150 ml d'iso-octane et l'insaponifiable est extrait du milieu après 3 hr d'ébullition. L'opération est répétée deux fois. Les acides sont libérés de leurs sels par l'acide chlorhydrique concentré puis extraits par l'iso-octane bouillant, comme précédemment l'insaponifiable.

Après évaporation du solvant, les acides sont méthylés par un excès de méthanol, en présence d'acide para-toluène-sulfonique comme catalyseur. La méthylation dure 3 hr à la température d'ébullition du mélange, sous réfrigérant à reflux. Le méthanol est ensuite évaporé et les esters méthyliques sont repris par de l'iso-octane bouillant, après dissolution du catalyseur dans de l'eau bouillante.

### *Séparation des Acides Normaux et des Hydroxyacides*

Cette séparation est effectuée par chromatographie d'adsorption, selon la méthode de Downing *et al.*<sup>4</sup> Dans l'appareil à jaquette chauffante précédemment décrit<sup>5</sup> on prépare, sous iso-octane, une colonne de trisilicate de magnésium de 25 cm de hauteur et 2 cm de diamètre. La température de la colonne est fixée à 50°. Le mélange des esters méthyliques est versé sur la colonne puis chromatographié grâce à une légère surpression créée par un courant d'air au-dessus de la colonne.

Les acides normaux (méthylés) sont élués par 750 ml d'iso-octane. Les hydroxyacides (méthylés) sont élués ensuite par 1000 ml du mélange méthanol-chloroforme (1/10 en volumes).

Les spectres infrarouges des deux fractions éluées ont été réalisés:<sup>13</sup> la bande d'absorption caractéristique du groupement -OH à 2.93  $\mu$ , n'apparaît que dans la fraction des hydroxyacides (Fig. 4).

### *Acétylation des Hydroxyacides*

Cette acétylation se fait en présence de pyridine selon la méthode décrite précédemment pour les diols des cires.<sup>5</sup>

### *Technique Chromatographique*

Les analyses ont été effectuées dans un appareil Jobin et Yvon (Arcueil) muni d'un catharomètre à filaments de tungstène. Nous avons utilisé des colonnes conventionnelles en acier inoxydable de 2 m de long et 4 mm de diamètre intérieur. La phase stationnaire employée était le silicium 710 imprégnant de la brique C22 (de calibre 60-80 mesh). Nous utilisons 20 g de phase stationnaire pour 100 g de brique.

Le gaz vecteur était l'hélium, circulant à travers la colonne avec un débit de 7 l./hr. Le gaz sortait de la colonne à la pression atmosphérique. La surpression à l'entrée était de 1000 g/cm.<sup>2</sup>

Chromatographié dans ces conditions, un hydroxyacide (transformé en acétoxyester méthylique) présente un volume de rétention à peu près équivalent à celui de l'acide normal

<sup>13</sup> Nous remercions Mme CAZES (Laboratoire de Chimie macromoléculaire du CNRS) qui nous a réalisé les spectres.

méthylé possédant 6 atomes de carbone en plus (Fig. 2). Ce résultat peut être comparé avec ceux obtenus par Lefort, Pourchez et Paquot<sup>14</sup> sur une colonne de polyester (à 232°C); ces auteurs trouvent par exemple que l'acide acetoxy-12-octadécanoïque méthylé (acetoxyester en C<sub>18</sub>) présente à peu près le même volume de rétention que l'acide normal méthylé possédant 24 atomes de carbone (La "longueur de chaîne équivalente" réellement trouvée par ces auteurs est 23,7 atomes de carbone).

Les temps de rétention que nous observons pour les dérivés oxygénés des acides gras sont aussi du même ordre que ceux observés par Kitagawa, Sugai et Kummerow.<sup>15</sup> Ces auteurs trouvent par exemple un temps de rétention de 8,7 min pour le méthyl-12-acétoxystéarate chromatographié à 239°C sur silicone Rubber.

<sup>14</sup> D. LEFORT, A. POURCHEZ et C. PAQUOT, 319 in *Separation immédiate et Chromatographie*; GAMS éditeur, Paris, 350 pp. (1961).

<sup>15</sup> I. KITAGAWA, M. SUGAI and F. A. KUMMEROW, *J. Am. Oil Chemists Soc.* **39**, 217 (1962).