



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude des cires de tourbes et d'acides humiques

Jean-Claude Wilhelm

► **To cite this version:**

Jean-Claude Wilhelm. Contribution à l'étude des cires de tourbes et d'acides humiques. Chimie analytique. Université Paul Verlaine - Metz, 1974. Français. NNT: 1974METZ003S . tel-01775535

**HAL Id: tel-01775535**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775535>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

S/Mz 74/3

21 ex

# THÈSE

présentée

A L'U. E. R. "SCIENCES EXACTES ET NATURELLES"  
DE L'UNIVERSITÉ DE METZ

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ (III<sup>e</sup> Cycle)  
Mention Chimie Analytique

par

**Jean-Claude WILHELM**

Licencié ès-Sciences Physiques

Assistant à la Faculté des Sciences de Metz

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19740155
Cote	S/Mz 74/3
Loc	Magasin

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CIRES DE TOURBES ET D'ACIDES HUMIQUES

---

Soutenue le 1<sup>er</sup> mars 1974 devant la commission d'examen

Président: Monsieur J.-M. BLOCH, Professeur

Examineur: Madame D. CAGNANT, Professeur

Monsieur J.-M. JOUANY, Maître de Conférences

UNIVERSITE DE METZ

Président : Mr. LONCHAMP J.P.

U.E.R. " Sciences Exactes et Naturelles "

Directeur : Mr. RHIN G.

PROFESSEURS :

M. LONCHAMP J.P.	T.T.P. Physique
M. BARO R.	T. Physique
Mme CAGNIANT D.	P.S.C. Chimie
M. LERAY J.	P.S.C. Physique
M. BLOCH J.M.	T. Chimie
M. KLEIM R.	P.S.C. Physique
M. CHARLIER A.	P.S.C. Physique
M. TAVARD C.	P.S.C. Physique
M. PELT J.M.	T Biologie végétale

MAITRES DE CONFERENCES :

M. CERTIER	Physique
M. WEBER J.D.	Mécanique
M. WENDLING E.	Chimie
M. BAUDELET B.	Physique
M. CARABATOS C.	Physique
M. FALLER P.	Chimie
M. JOUANY J.M.	Toxicologie
M. RHIN G.	Mathématiques
Mme SEC A.	Mathématiques
M. MORIN B.	Mathématiques
M. DAX J.P.	Mathématiques

MAÎTRE DE CONFERENCES ASSOCIE :

M. YUEN P.	Mathématiques
------------	---------------

CHARGE D'ENSEIGNEMENT :

Mme SCHWARTZBROD J.	Microbiologie
---------------------	---------------

La présent travail a été effectué dans le laboratoire de Chimie Minérale et Analytique de la Faculté des Sciences de METZ, sous la direction de Monsieur J.M. BLOCH, Professeur.

Qu'il me soit permis de le remercier pour l'appui et les conseils qu'il m'a toujours prodigués.

Je tiens à remercier Madame D. CAGNIANT, Professeur, qui a bien voulu juger ce travail et qui m'a apporté ses conseils précieux dans l'exécution de ce travail.

Je remercie également Monsieur J.M. JOUANY, Maître de Conférences, qui m'a fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Les compositions centésimales ont été déterminées par le service de microanalyse du laboratoire de Chimie Organique dirigé par Madame D. CAGNIANT. Qu'elle en soit remerciée, ainsi que le personnel technique pour son obligeance.

Les spectres de masse ont été établis par les soins de Monsieur G. TELLER, dans le laboratoire de Spectrographie de Masse de Monsieur le Professeur R. WOLFF. Qu'ils en soient ici remerciés, ainsi que pour leurs bons conseils.

Je remercie vivement Monsieur A. THIL pour la qualité des figures.

Je remercie également tous mes collègues du laboratoire de Chimie Minérale pour leur amicale collaboration, ainsi que Mademoiselle BIEHLMANN pour son aide technique.

Je remercie le personnel administratif pour la qualité de la dactylographie et de l'impression de cette thèse.

A MA FEMME

A VALERIE ET A SOPHIE

A MES PARENTS

## TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	
I- Définitions	1
II- But de nos recherches	3
CHAPITRE I	
Etude bibliographique préliminaire	
I- Substances cireuses trouvées dans les sols et les tourbes	4
II- Existence de cires dans les acides humiques et fulviques	9
III- Théories relatives à leur origine	11
CHAPITRE II	
Etude physico-chimique préliminaire	
I- Extraction-Solubilité	14
II- Saponification	15
III- Caractéristiques chimiques	
1° Composition	16
2° Masse molaire	17
3° Indice d'iode	18
4° Indice de méthoxyle	19
5° Acidité	19
6° Fonctions hydroxyle et carbonyle	20
IV- Etude de l'insaponifiable	
1° Réactions qualitatives des stérols	21
2° Recherche de polyols	22

V-	Etude spectroscopique	<u>Page</u>
	1° Spectres UV	23
	2° Spectres IR	23
	3° Spectres RMN	27

### CHAPITRE III

Analyse chromatographique de la cire acide.

Identification d'acides gras.

I-	Identification d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse	
	1° Généralités	30
	2° Analyse par CPV à température de colonne constante	31
	3° Analyse quantitative des acides gras	41
	4° Identification d'alcools gras dans l'insaponifiable	46
II-	Chromatographie d'adsorption de la cire sur gel de silice	
	1° Mode opératoire	47
	2° Résultats	48
III-	Conclusion	52

### CHAPITRE IV

Identification des constituants des cires par utilisation couplée de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse

I-	Etude bibliographique de la fragmentation des esters méthyliques d'acides gras en spectrométrie de masse	54
II-	Résultats obtenus avec nos produits	
	1° Identification des esters méthyliques d'acides gras contenus dans la cire	56

	<u>Page</u>
2° Anomalies	57
III- Spectrométrie de masse par introduction directe	60
IV- Conclusions	62
CHAPITRE V	
Etude des produits de dégradation de la cire	
I- Dégradations oxydatives	
1° Ozonolyse	85
2° Action d'un periodate en présence de $\text{KMnO}_4$	86
3° Hydroxylation par l'acide peracétique	87
4° Commentaires	88
II- Hydrogénation de la cire brute et de la cire acide	
1° But recherché	89
2° Réduction par $\text{LiAlH}_4$	89
3° Hydrogénolyse de dérivés iodés	90
4° Méthode universelle de Berthelot	91
III- Réduction de l'éluat B par HI	93
IV- Spectrométrie de masse	95
V- Conclusion	95
CONCLUSIONS GENERALES	97
ANNEXES	102
BIBLIOGRAPHIE	107

## I N T R O D U C T I O N

I - DEFINITIONS

Le terme "cires" s'applique dans un sens restreint à des esters d'acides gras et d'alcools gras à longue chaîne (cérides). Dans un sens plus large, on peut l'appliquer à une grande variété de substances organiques : cérides, stérides, acides gras, alcools gras ou stérols libres, hydrocarbures, cétones à longue chaîne, etc, qui accompagnent les cérides au cours de leur extraction (1, p. 581).

Généralement les auteurs utilisent le terme "bitumes" pour désigner l'ensemble des substances obtenues par extraction d'un sol (tourbe, lignite, sol de jardins, etc) à l'aide d'un solvant neutre bouillant, sous la pression normale, par exemple l'éther de pétrole ou encore un mélange benzène-éthanol.

Les bitumes sont divisés arbitrairement en "cires", "résines" et "asphaltes". Cette terminologie est empruntée à l'industrie des cires de lignite (Montan Wax), les cires de tourbe étant utilisées parfois en remplacement des cires de lignite dans la fabrication de cirages, émulsions, etc. Les définitions de ces fractions, basées sur des différences de solubilité, varient largement suivant les auteurs.

Comme exemple donnons la définition utilisée par IKAN et coll. (2) :

Asphaltes : fraction des bitumes insoluble à chaud dans  
l'éthanol.

Cires : fraction soluble à chaud mais qui précipite dans  
l'éthanol refroidi.

Résines : fraction soluble à froid.

Ce fractionnement grossier ne présente un intérêt que dans la préparation industrielle des cires, où l'on cherche à obtenir un taux minimum des substances indésirables contenues dans les résines et les asphaltes. Pour notre part nous avons choisi l'éther éthylique comme solvant d'extraction. Bon solvant des graisses et des composés à longue chaîne, il extrait davantage de substances que le n-hexane, que nous avons initialement utilisé pour "dégraisser" l'acide humique. Nous conviendrons d'utiliser le terme "cires" pour désigner l'ensemble des substances solubles dans l'éther éthylique bouillant, extraites d'une tourbe vendue dans le commerce sous l'appellation "Floratorf" (tourbière d'Allemagne du Nord, horizon A<sub>0</sub>). Ces cires se trouvent également dans l'acide humique (HHm) provenant de cette tourbe. Celui-ci faisant l'objet d'autres travaux dans notre laboratoire, nous en donnons simplement une définition succincte : l'acide humique peut être défini comme une substance organique des sols (en particulier de tourbes) soluble dans des solutions aqueuses de bases (soude, ammoniacale) ; après acidification par un acide fort, les acides humiques précipitent, laissant en solution les "acides fulviques" (voir annexe I).

Les travaux récents de notre laboratoire concernant HHm (3, 4, 5), ont mis en évidence un motif élémentaire résultant de la condensation de glucides et d'acides-amino. Six sucres (arabinose, rhamnose, xylose, galactose, glucose, mannose) et au moins six acides-amino (valine, leucine, glycine, sérine, alanine, acide glutamique) ont été identifiés. La cire faisant l'objet du présent travail peut être, soit adsorbée par l'ensemble des motifs biologiques décrits ci-dessus, soit liée à ceux-ci par liaison chimique, (par exemple ester) car la dégradation de l'acide

humique permet (voir p. 15 ) de libérer de nouvelles substances extractibles à l'éther.

## II - BUT DE NOS RECHERCHES

Cette étude a été entreprise dans un double but :

a) Identification de la fraction cireuse présente dans les colloïdes organiques du sol : cette fraction est susceptible de fixer des composés liposolubles tels que les pesticides chlorés ou organophosphorés.

b) D'autre part l'origine de l'acide humique est encore mal connue et plusieurs hypothèses à ce sujet font l'objet de controverses : il pourrait provenir de la dégradation de la lignine ou au contraire serait synthétisé aux dépens de la cellulose par divers microorganismes. Les cires pourraient révéler une activité bactérienne ou fongique génératrice d'acide humique.

Avant d'exposer nos résultats, nous donnons un aperçu des recherches entreprises à ce jour sur les cires ou les bitumes extraits de tourbes. La plupart de ces travaux conduisent à l'identification de quelques substances présentes en faible quantité ou d'une classe de composés (acides gras, par exemple). L'analyse systématique des cires aussi bien qualitative que quantitative a rarement été tentée. En particulier, les substances inconnues, qui constituent la grosse majorité des cires extraites des diverses tourbes, n'ont reçu que peu d'attention, certainement en raison de leur résistance à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse et, à notre connaissance, aucune tentative n'a été effectuée pour tenter d'élucider leur structure à l'aide de méthodes d'analyse chimique (oxydation, réduction, dégradation).

## CHAPITRE I

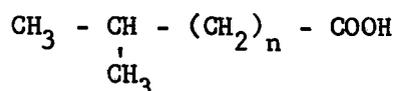
## E T U D E   B I B L I O G R A P H I Q U E   P R E L I M I N A I R E

I - SUBSTANCES CIREUSES TROUVEES DANS LES SOLS ET LES TOURBES

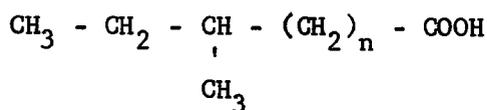
Les ouvrages de BREGER (6) et de EGLINTON et MURPHY (1) font le point sur les connaissances actuelles en géochimie.

La présence d'hydrocarbures dans la matière fossile est quasi universelle. On trouve principalement des n-alcanes, des stérantes et des hydrocarbures à structure isoprénique. Les hydrocarbures aromatiques, moins répandus, dérivent peut-être de stéroïdes ou de terpénoïdes. Les hydrocarbures insaturés (principalement des terpènes), très répandus dans le règne vivant, sont très rares dans la matière fossile (6, chap. 12 ; 1, chap. 13).

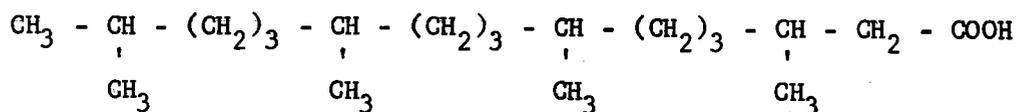
Les acides gras se trouvent dans de nombreux sédiments, même très anciens (500 millions d'années). En majorité il s'agit d'acides gras normaux, mais également d'acides mono ou polysubstitués par des groupements méthyles (acides iso, antéiso ou à structure isoprénique). Les acides insaturés, les diacides gras et les alcools gras sont assez rares (6, chap. 12 ; 1, chap. 14).



Acide iso



Acide antéiso



Acide à structure isoprénique : acide phytanique

Les terpénoïdes et les stéroïdes ont été isolés principalement à partir de lignites et de tourbes (6, chap. 12 ; 1, chap. 16).

Les auteurs ont également trouvé des pentoses, des hexoses, des polyholosides, ainsi que des acides aminés, libres ou combinés, dans les fossiles, les sédiments, les roches et les sols (6, chap. 10 et 11 ; 1, chap. 15 et 18).

Dès 1909, RYAN et DILLON (7) étudient une cire commerciale appelée "Montana Wax", probablement obtenue à partir de tourbe. Par saponification et précipitation, ils pensent avoir obtenu de l'acide montanique ( $\text{C}_{28} \text{H}_{56} \text{O}_2$ ).

TITOW (1932) (8) étudie les bitumes extraits d'une tourbe de sphaigne provenant d'URSS. Dans l'insaponifiable, il note la présence des hydrocarbures en  $\text{C}_{35} \text{H}_{72}$  et  $\text{C}_{33} \text{H}_{68}$  et de l'alcool  $\text{C}_{27} \text{H}_{56} \text{O}$ . Par distillation fractionnée sous vide de la fraction saponifiable des bitumes sous formes d'esters éthyliques, il pense avoir isolé les acides en  $\text{C}_{25} \text{H}_{50} \text{O}_2$  et  $\text{C}_{27} \text{H}_{54} \text{O}_2$ .

RAKOWSKI et EDELSTEIN (9) trouvent les acides  $\text{C}_{26} \text{H}_{52} \text{O}_2$ ,  $\text{C}_{27} \text{H}_{54} \text{O}_2$ ,  $\text{C}_{28} \text{H}_{56} \text{O}_2$  dans les cires d'une tourbe extraite des marais de Redkinski (URSS).

En 1936, ROGINSKAYA (10) signale la présence des acides  $C_{27}H_{54}O_2$ ,  $C_{29}H_{58}O_2$  et  $C_{28}H_{56}O_2$  dans les cires d'une tourbe russe.

REILLY et WILSON (11) isolent d'une cire de tourbe irlandaise (Mona Wax), de l'acide cérotique ( $C_{26}H_{52}O_2$ ) et de l'acide carbocérique ( $C_{27}H_{54}O_2$ ).

Les méthodes de séparation (distillation fractionnée, recristallisation) et d'identification (composition centésimale, indice d'iode, indice d'hydroxyle, indice d'acidité, point de fusion) (voir chap. II) apparaissent aujourd'hui bien insuffisantes pour l'analyse de mélanges aussi complexes, qui semblent, comme on peut le constater, contenir essentiellement des acides gras linéaires.

C'est ainsi que REILLY et coll. (12a) tentent de décolorer la "Mona Wax" par traitement avec  $CrO_3$  dans l'acide acétique. Ils isolent alors de l'acide béhénique ou docosanoïque ( $C_{22}H_{44}O_2$ ). Cet acide est analysé, puis examiné aux Rayons X par CARLISLE et CROWFOOT (12b) : malgré plusieurs distillations fractionnées, il contient encore de l'acide eicosanoïque ( $C_{20}H_{40}O_2$ ) dans la proportion de 2,5 à 10 pour 100 d'acide béhénique, ainsi que des traces d'acide tétracosanoïque ( $C_{24}H_{48}O_2$ ).

Les spectres de diffraction par les rayons X obtenus par VOLAROVICH (13) montrent une similitude entre les hydrocarbures aliphatiques saturés et les cires de tourbes. L'auteur attribue les variations du paramètre  $a$  de la maille élémentaire mesurée à la présence possible d'hydrocarbures cycliques possédant une longue chaîne latérale.

KAGANOVICH et coll. (14) séparent, par cristallisation fractionnée, divers acides gras (arachidique, béhénique, lignocérique, mélistique), tandis que BEL' KEVICH et coll. (15), d'une manière analogue, isolent de

la fraction insaponifiable des cires, des alcools gras et un stérol de formule brute  $C_{27} H_{46} O$ . D'autres travaux de BEL' KEVICH et coll. (16) par chromatographie d'adsorption sur alumine, notent la présence d'hydrocarbures de haut poids moléculaire  $(C_{15} H_{28})_n$  et d'un composé de formule brute  $C_{15} H_{16}$  (P.F. = 230°C).

Ils obtiennent également, dans l'une de leur fraction chromatographique, un composé possédant les mêmes propriétés que le  $\beta$  - sitostérol identifié par le point de fusion de l'acétate et du benzoate et par son spectre infra-rouge (17).

Une autre fraction présente quelques réactions qualitatives positives des stéarines (18).

THOMAS (19) chromatographie des bitumes, présentant un maximum d'absorption en ultra-violet à 285 nm, sur une résine échangeuse d'anions et étudie les spectres infra-rouge des bitumes et des différentes fractions obtenues. Les spectres indiquent surtout une structure aliphatique, bien que les éluants les plus acides semblent libérer des esters aromatiques possédant peut-être des fonctions phénols ou d'autres groupements ionisables.

KWIATOWSKI (20) étudie le comportement de bitumes sur colonne d'alumine et met en évidence des acides riches en oxygène (peut-être des acides hydroxylés) et des acides gras en  $C_{20}$  à  $C_{30}$ . A l'aide de méthodes chromatographiques (colonne d'alumine, couches minces, chromatographie en phase vapeur) et des méthodes conventionnelles de caractérisation chimique (21), il montre que la composition des résines obtenues varie largement suivant la méthode d'extraction des bitumes et suivant le solvant utilisé pour séparer les résines des bitumes, à partir d'une même tourbe. Les résines contiennent des hydrocarbures, des composés hydroxylés, peu d'acides et de nombreuses substances inconnues.

SUNDGREN et RAUHALA se sont intéressés à plusieurs reprises aux acides contenus dans les cires de tourbe (22, 23, 24, 25). A l'aide de la chromatographie sur colonne d'alumine et des méthodes chimiques conventionnelles, RAUHALA suppose la présence d'acides hydroxylés dans les cires (24), responsables des réactions de polycondensation observées lorsque l'on chauffe les cires et les résines (23). SUNDGREN et RAUHALA peuvent mettre en évidence par chromatographie en phase gazeuse (CPV) des acides gras saturés linéaires de  $C_{16}$  à  $C_{29}$ , avec un maximum pour les acides en  $C_{24}$  et  $C_{26}$ , sans parvenir à isoler et identifier d'acides hydroxylés (25).

MORRISON et BICK (26) comparent les cires extraites d'une tourbe et d'un sol de jardin. Les résultats obtenus après fractionnement sur colonne d'alumine et par CPV indiquent dans la fraction saponifiable des cires la présence d'acides gras normaux de  $C_{18}$  à  $C_{34}$  (24 % de la cire de tourbe et 30 % de la cire du sol de jardin, avec un maximum pour les acides en  $C_{24}$ ,  $C_{26}$ ,  $C_{28}$ ,  $C_{30}$ ). Dans l'insaponifiable ils identifient des alcools gras normaux de  $C_{16}$  à  $C_{30}$ , des alcanes non ramifiés de  $C_{16}$  à  $C_{33}$ , avec des traces d'alcanes de  $C_{16}$  à  $C_{20}$ . De la même manière ils identifient des méthylcétones de  $C_{17}$  à  $C_{35}$  (0,5 % des cires de tourbe) (27).

A partir d'une tourbe récente d'Israel, IKAN et coll. (2) séparent, par CPV, sous forme d'esters méthyliques, des acides gras normaux de  $C_{12}$  à  $C_{26}$  avec un maximum pour les acides en  $C_{16}$  et  $C_{18}$ ; le spectre de masse du mélange d'esters présente un pic à  $m/e = 74$  caractéristique des esters méthyliques d'acides gras, ainsi que les pics moléculaires correspondant aux différents esters.

IVANOVA et coll. (28) séparent également par CPV des acides gras normaux de  $C_{14}$  à  $C_{28}$  avec un maximum pour les acides en  $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{26}$ : 14, 40 et 26 % respectivement.

Les travaux les plus récents concernant les cires de tourbe (25, 26, 27, 28, 37, 38) confirment la prépondérance des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone.

D'autre part, par fractionnement chromatographique de l'insaponifiable des cires extraites des mousses d'une tourbière canadienne, IVES et O'NEILL (29, 30) isolent un mélange de  $\beta$ -sitostérol et de  $\beta$ -sitostanol et trois triterpénoïdes :  $\alpha$ -amyrine, taraxérone et taraxérol.

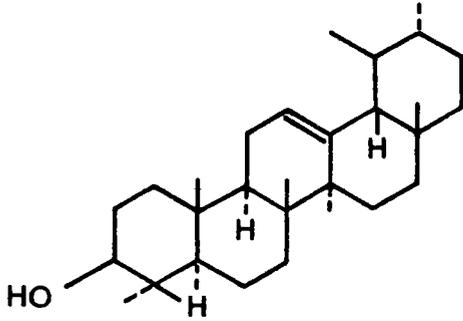
A partir d'une tourbe écossaise, Mc LEAN et coll. (31) obtiennent un mélange inséparable de  $\beta$ -sitostérol et de  $\beta$ -sitostanol et un triterpénoïde, l'épi-friédélanol.

IKAN et coll. (32) mettent en évidence dans la tourbe d'Israël citée ci-dessus (2) les composés suivants : friédéline, épi-friédélanol,  $\beta$ -sitostérol et  $\beta$ -sitostanol mélangés.

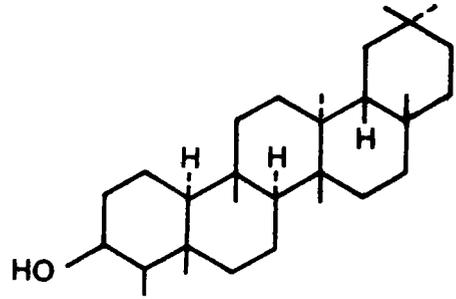
D'autres composés ont également été signalés dans la tourbe : pérylène (33, 34), vitamines B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> (35).

## II - EXISTENCE DE CIRES DANS LES ACIDES HUMIQUES ET FULVIQUES

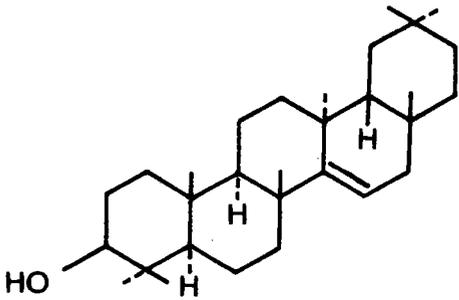
Les cires contenues dans les acides humiques et les acides fulviques n'ont fait l'objet que de peu d'études. OGNER et SCHNITZER (36) après extraction successive des acides fulviques à l'hexane, au benzène et à l'acétate d'éthyle, ont isolé des hydrocarbures (0,16 % des acides fulviques), dont un tiers de n-alcanes et deux tiers d'alcanes cycliques ou ramifiés. La longueur de chaîne des n-alcanes varie entre 14 et 36 atomes de carbone. Des mêmes acides fulviques, SCHNITZER et OGNER (37) isolent des acides gras normaux de C<sub>14</sub> à C<sub>36</sub> (0,1 % des acides fulviques)



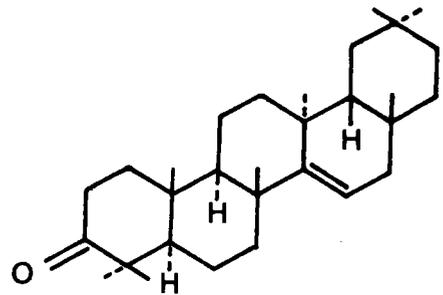
$\alpha$ -Amyrine



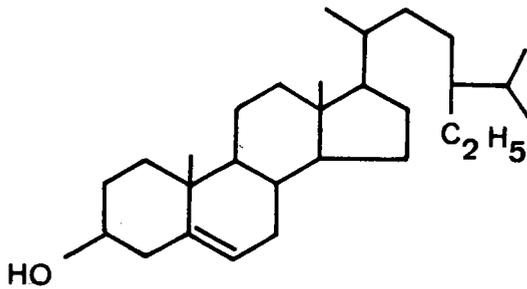
Epi-Friedélanol



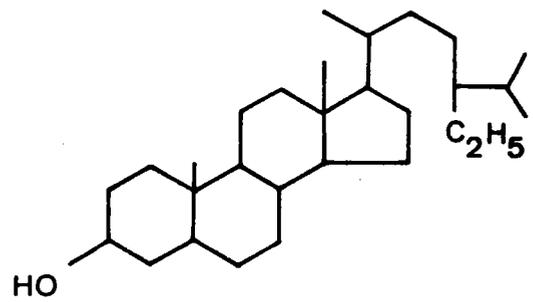
Taraxérol



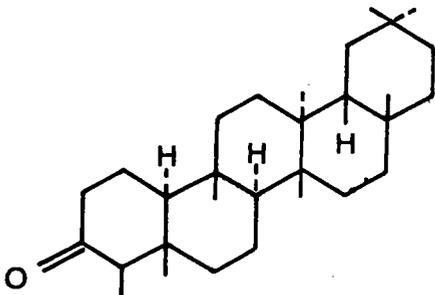
Taraxérone



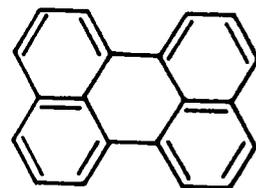
$\beta$ -Sitostérol



$\beta$ -Sitostanol



Friedéline



Pérylène

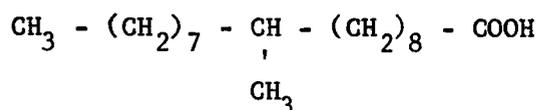
avec un maximum pour l'acide en  $C_{24}$ . Des résultats analogues ont été obtenus par KHAN et SCHNITZER (38), à partir d'acides humiques (alcanes 0,34 %, acides 0,47 % de Hhm). Les substances qui ont pu être identifiées ne constituent donc qu'une faible partie de la cire totale extraite de l'acide humique.

Signalons de plus que l'analyse et, d'une façon générale, l'étude des "acides fulviques" est particulièrement délicate : en effet ceux-ci ne constituent qu'une fraction infime des colloïdes organiques du sol, possédant une fonction acide : leur extraction est basée sur leur propriété de ne pas précipiter en milieu chlorhydrique, contrairement aux acides humiques. Notre expérience nous a prouvé que le rendement en acides fulviques est d'environ  $10^{-3}$  g par litre à partir des tourbes.

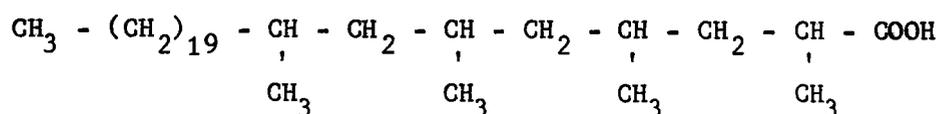
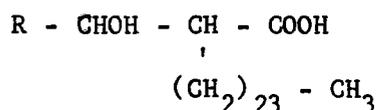
### III. THEORIES RELATIVES A LEUR ORIGINE

Les microorganismes (champignons, algues, bactéries) jouent certainement un rôle important dans les processus de fossilisation. On a trouvé, par exemple, dans une tourbière d'URSS, une concentration de  $7 \cdot 10^8$  bactéries par gramme de tourbe sèche à la surface et de  $25 \cdot 10^6$  jusqu'à 6 mètres de profondeur. D'autres travaux démontrent la présence de spores de champignons jusqu'à 60 cm de profondeur ( $3 \times 10^6$  spores par gramme de tourbe en été, et  $17 \times 10^4$  en hiver). Les mécanismes chimiques, probablement de nature enzymatique, qui pourraient avoir lieu sont peu connus (1 chap. 11) : les acides gras proviennent peut-être de restes végétaux ou sont synthétisés par des bactéries.

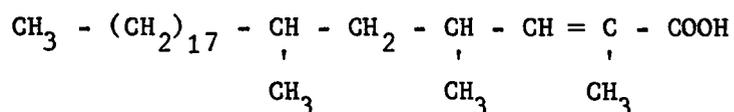
D'autre part, on sait que les cires de bactéries ont fait l'objet d'importantes recherches (39). Bien que ces études se rapportent principalement à des espèces pathogènes (bacille de la tuberculose en particulier), elles peuvent éclairer la chimie microbienne du sol. Elles ont mis en évidence des acides mono ou polyméthylés, des acides possédant une longue chaîne latérale, ainsi que des acides hydroxylés. En voici ci-dessous quelques exemples :



Acide tuberculostéarique

Acide C<sub>32</sub>-mycocérosique

Acides mycoliques

Acide C<sub>17</sub>-phtiénoïque

En résumé les auteurs ont essentiellement trouvé : d'une façon générale dans les sols, des hydrocarbures acycliques, des acides de  $C_{16}$  à  $C_{36}$ , de petites quantités d'acides hydroxylés. Les alcools sont moins bien connus : il y a peu de polyols courants tels que le glycérol, de petites quantités de certains stérols ou d'alcools triterpéniques.

Dans les cires de tourbes, le problème reste entier, puisque les recherches n'ont permis de caractériser que 10-25 % de la cire totale : si ces substances ont une origine microbienne ou fongique, il est possible que l'on puisse trouver des acides bien caractéristiques des mycobactéries.

CHAPITRE IIETUDE PHYSICO - CHIMIQUE PRELIMINAIRE DES CIRES  
CONTENUES DANS LES TOURBES ET L'ACIDE HUMIQUE

Nous étudions parallèlement les cires extraites d'une tourbe provenant d'Oldenburg (R.F.A.) et de l'acide humique préparé à partir de cette tourbe (3) par traitement ammoniacal, suivi d'une acidification et d'une électrodialyse prolongée (voir annexe I).

I - EXTRACTION - SOLUBILITE

a) L'extraction des cires à partir de la tourbe est effectuée à l'éther éthylique dans un extracteur de Kumawaga ou de Soxhlet, pendant 12 heures environ pour 9 g de tourbe "Floratorf" sèche. On arrête l'extraction lorsque la phase étherée reste incolore dans le siphon de l'extracteur. Après évaporation du solvant, on obtient 2,3 à 2,8 % de cire présentant une coloration brune qui s'accroît par chauffage à partir de 60°C. Son point de fusion, mal défini, se situe vers 72°C.

Le même rendement en cires est obtenu lorsque l'on agite préalablement la tourbe avec HCl N pendant 24 heures, dans le but d'hydrolyser d'éventuels savons.

b) L'acide humique extrait de la tourbe "Floratorf", libère environ 7 % de cire dans les mêmes conditions. Des substances cireuses apparaissent d'ailleurs à tous les stades de la préparation ou de la dégradation de HHm. Ainsi, après extraction des cires, puis décoloration

par l'acide peracétique (3), HHm libère à nouveau 7 % de cire. Une simple extraction ne suffit donc pas à libérer la totalité des cires fixées sur HHm. L'oxydation peracétique de HHm semble donc détruire les sites responsables de la fixation des cires.

Les liaisons unissant HHm et les cires sont probablement dues à des phénomènes d'adsorption, mais de véritables liaisons chimiques ne sont pas à exclure par exemple entre certains acides gras et certaines fonctions alcool des glucides. KHAN et SCHNITZER (38) supposent que leur acide humique extrait d'un tchernozone noir du Canada, possède une structure du type tamis moléculaire, capable de fixer des composés hydrophobes.

c) Solubilité : Les meilleurs solvants de nos cires sont le chloroforme, le benzène et la pyridine froids, l'éther éthylique, les alcools éthylique et méthylique bouillants. La solubilité n'est que partielle, même à chaud, dans les alcanes légers, le sulfure de carbone et le tétrachlorure de carbone.

## II - SAPONIFICATION

La saponification d'environ 1 g de cire brute est effectuée dans 50 ml de soude éthanolique N/2, par chauffage sous reflux pendant 4 heures. L'hydrolysate est ensuite transféré dans une ampoule à décanter et dilué avec 500 ml d'eau ou de préférence avec une solution de NaCl saturée. On extrait l'insaponifiable avec trois portions de 100 ml d'éther éthylique, en prenant soin de laisser toute émulsion dans l'ampoule. Les phases éthérées réunies sont lavées trois fois avec 20 ml de soude N/10, puis avec des portions de 20 ml d'eau distillée, jusqu'à neutralité des eaux de lavage. Après séchage sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, puis évaporation du solvant,

on obtient 20 à 23 % d'insaponifiable. La phase aqueuse, à laquelle on adjoint les différentes eaux de lavage, est acidifiée par HCl concentré et extraite plusieurs fois avec 100 ml d'éther.

L'extrait étheré fournit ainsi 65 à 77 % d'une phase contenant probablement la totalité des acides de notre cire, phase que nous appellerons "cire acide", aussi bien pour la cire extraite de la tourbe que pour la cire extraite de HHm. Les pertes varient suivant les manipulations entre 0 et 15 %.

La masse molaire moyenne (voir ci-dessous) de la cire acide n'accuse pas de diminution notable lorsqu'on utilise des temps d'hydrolyse plus longs (12 heures ou 24 heures). Il en est de même lorsqu'on effectue la saponification à plus haute température, c'est-à-dire en utilisant comme solvant le glycol éthylénique ou le diméthyl-sulfoxyde.

La consommation de soude, déterminée suivant une méthode classique de mesure des indices de saponification (40, p. 181) est de l'ordre de 1,4 milli-équivalents (méquiv) pour 1 g de cire. Les dosages effectués en présence de phénol-phtaléine ou par potentiométrie, sont peu précis du fait de la très grande complexité du mélange de cires et de leur forte coloration brune, d'ailleurs plus accentuée en milieu basique.

### III - CARACTERISTIQUES CHIMIQUES

#### 1°) Composition

Les résultats des analyses de divers échantillons sont donnés dans le tableau I. Les teneurs en oxygène sont obtenues par différence. Le pourcentage d'azote est dans tous les cas inférieur à 1 %. Le taux de cendres de nos échantillons, dans lesquels nous n'avons pu déceler ni phosphore

ni soufre, n'excède pas 0,15 %. Les écarts observés entre les différents résultats traduisent un certain manque d'homogénéité des divers échantillons.

Echantillon	C %	H %	O %
Cire brute	76,94	11,55	11,51
Cire brute	75,18	11,67	13,15
Cire brute *	75,44	10,58	13,98
Moyenne	75,8	11,3	12,9
Cire acide	74,55	11,06	14,39
Cire acide	75,20	11,04	13,76
Moyenne	74,9	11,05	14,05
Insaponifiable	78,74	11,50	9,76
Insaponifiable	79,69	11,27	9,04
Moyenne	79,2	11,4	9,4

TABLEAU I : Composition centésimale de la cire brute et de la cire saponifiée.

## 2°) Masse molaire

Les masses molaires moyennes en nombre (tableau II) sont déterminées dans le chloroforme à 37°C par tonométrie, à l'aide d'un pont de mesure "KNAUER". Pour obtenir une précision suffisante, la concentration des échantillons doit être supérieure à 10 g/litre.

\* Analyse effectuée par le service de microanalyse du C.N.R.S.

Cire brute	Cire acide	Insaponifiable
1111	634	472
1060	643	480
915	615	500
1030	727	Moy. 484 ± 50
1065	695	
Moy. 1036±100	800	
	Moy. 686±70	

TABLEAU II : Masse molaire moyenne des cires.

Pour vérifier la validité des mesures, nous avons déterminé la masse molaire de l'acide stéarique. La valeur trouvée est environ 1,3 fois trop forte, tandis que celle obtenue pour le stéarate de méthyle est correcte. Ceci s'explique par les associations par liaisons hydrogène des fonctions COOH. Néanmoins, pour nos échantillons, les différences entre les masses molaires des produits méthylés et non méthylés n'excèdent pas les incertitudes expérimentales : par conséquent, il n'y a pas à tenir compte dans notre cas d'associations intermoléculaires.

### 3°) Indice d'iode

Il est déterminé selon la méthode de HANUS, modifiée par NORRIS et BUSWELL (40, p. 157) : l'indice d'iode exprime l'addition d'iode sur les doubles liaisons éthyléniques. Cet indice, utilisé surtout pour déterminer l'insaturation des huiles et des graisses alimentaires, correspond au poids d'iode, en grammes, fixé par 100 g de substance (voir annexe II).

Les résultats de plusieurs dosages donnent des indices compris entre 43,1 et 63,5 pour la cire brute, entre 40,6 et 73,6 pour la cire acide. La dispersion de ces résultats montre une fois encore la difficulté d'obtenir des échantillons de composition identique. D'autre part, il n'est pas possible de connaître, pour l'instant, l'influence de réactions de substitution ou secondaires de l'iode avec les nombreux composés de la cire.

#### 4°) Indice de méthoxyle

Le dosage des groupements  $-O-CH_3$  (éthers et esters méthyliques) est effectué à l'aide de la méthode de ZEISEL (40, p. 165) (voir annexe III).

L'indice de méthoxyle, nul avant méthylation (voir annexe IV), est voisin de 2,2 méquiv de groupement méthoxyle pour 1 g de cire acide.

#### 5°) Acidité

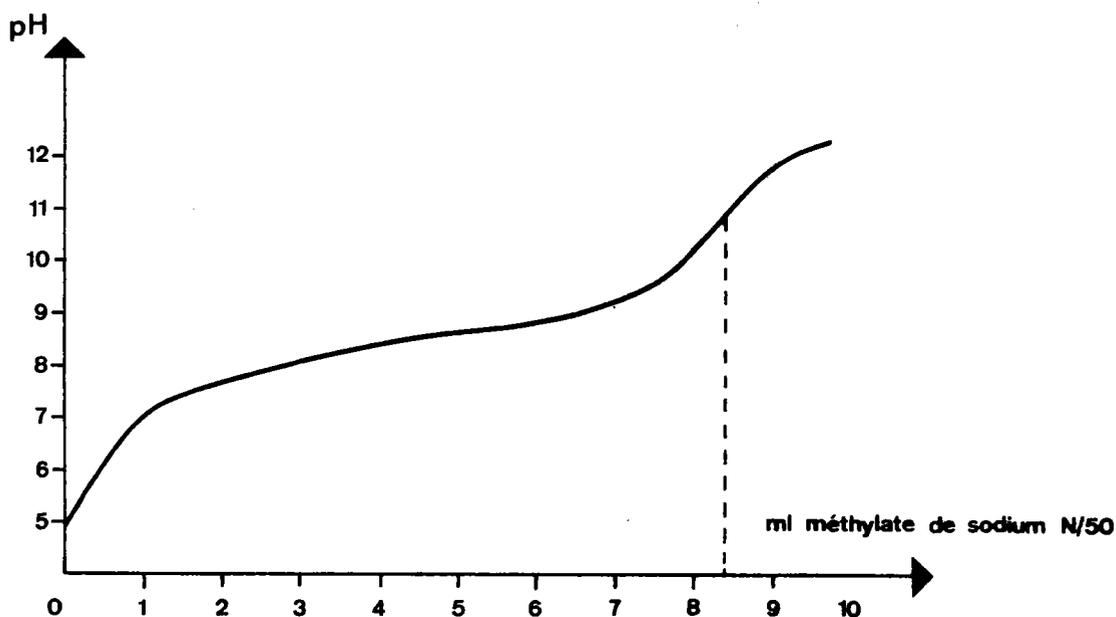


Fig. 1 : Exemple de dosage potentiométrique de la cire acide par le méthylate de sodium N/50.

Les dosages sont effectués en milieu non aqueux, dans un mélange benzène méthanol (4-1 v/v) proposé par LUGOWSKA et MACHTINGER (41). Une prise d'essai d'environ 0,1 g dissoute dans 100 ml de ce mélange, est titrée par du méthylate de sodium N/50 préparé dans le même mélange. Le point d'équivalence est déterminé par potentiométrie (fig. 1). Les résultats de plusieurs dosages donnent une acidité moyenne de  $1,0 \pm 0,1$  méquiv/g et de  $2,1 \pm 0,1$  méquiv/g, pour la cire brute et la cire acide respectivement.

Il faut remarquer que l'acidité totale des cires contenues dans 100 g de HHm (14 g maximum) n'excède donc pas  $14 \times 2,0 = 28$  méquiv. Elle n'intervient dans la capacité d'échange de HHm (450 méquiv/100 g  $\pm 30$ ) que dans la limite des incertitudes expérimentales.

#### 6°) Fonctions hydroxyle et carbonyle

Pour le dosage des fonctions -OH, on utilise une méthode d'acétylation par l'anhydride acétique en présence de pyridine. L'excès d'anhydride, décomposé par l'eau, est titré par la soude alcoolique (40, p. 174).

La détermination des fonctions C = O est basée sur la réaction de l'hydroxylamine avec les composés cétoniques (40, p. 178).

(Voir annexes V et VI).

D'après ces dosages, il y aurait moins d'un groupement -OH ou C = O pour 1000 g de cire.

Toutes ces déterminations sont souvent peu précises et peu reproductibles, à cause de la grande complexité du mélange de cires, de sa forte coloration brune ou encore de la solubilisation lente des

cires, surtout à froid, dans la plupart des réactifs. Elles sont surtout utiles dans le cas de composés chimiques purs et ne présentent, dans notre cas, qu'un intérêt qualitatif.

#### IV - ETUDE DE L'INSAPONIFIABLE

##### 1°) Réactions qualitatives des stérols

L'insaponifiable se présente sous forme d'une pâte jaune, fondant vers 55°C, moins colorée que la cire brute ou acide. Il donne quelques réactions qualitatives des stérols et des alcools triterpéniques. D'après ASSELINEAU (39), les lipides bactériens ne contiennent pas de stérols, contrairement aux lipides d'origine fongique.

##### a) Réaction de SALKOWSKI

Dans un tube à essais sec on ajoute 2 ml de  $H_2SO_4$  concentré à quelques mg d'insaponifiable dissous dans 2 ml de  $CHCl_3$  et on agite. La phase sulfurique se colore en rouge et jaune orangé.

##### b) Réaction de LIEBERMANN-BURCHARD

Dans un tube à essais sec on ajoute quelques gouttes de  $H_2SO_4$  concentré à quelques mg d'insaponifiable dissous dans 2 ml de  $CHCl_3$  et 2 ml d'anhydride acétique. Il apparait une coloration violette fugace qui vire au bleu, puis au vert. Cette coloration est stable pendant quelques heures à l'abri de la lumière.

c) Réaction de ZAK

En présence de quelques ml de  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$  à 1 g/litre dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré et de quelques ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  indifférent à l'anhydride chromique, l'insaponifiable développe une coloration rouge-brun.

Le dosage colorimétrique suivant la méthode au perchlorure de fer (42) ne peut être interprété convenablement sans connaître la nature exacte des composés responsables de la coloration.

2°) Recherche de polyols

Nous nous sommes demandé si la saponification ou l'hydrolyse acide par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N de la cire brute libérait des glucides ou des polyols (glycérol par exemple). En effet HHm est formé de glucides et d'acides : notre phase lipidique pourrait donc contenir des esters de glucides. Après hydrolyse acide par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N ou  $\text{HCl}$  N, la phase aqueuse est débarrassée des cires par extraction à l'éther, puis concentrée pour être étudiée par chromatographie sur papier. En utilisant comme éluant le mélange pyridine-benzène-butanol-eau- $\text{CH}_3\text{COOH}$  (3-1-5-3-1 v/v) et comme révélateur le chlorhydrate de para-anisidine dans le méthanol, nous avons pu mettre en évidence un sucre réducteur (glucose ou galactose). Par micro-dosage basé sur l'oxydation du glucose par le ferricyanure de potassium (43), nous avons pu déterminer que la quantité d'hexose présent n'excède pas 5 mg pour 1 g de cire brute.

D'autre part nous n'avons pu déceler la présence de glycérol.

Les quantités de glucides déterminées sont donc trop faibles pour provenir de l'hydrolyse de glycolipides. Il s'agit probablement de sucres provenant de HHm qui sont entraînés au cours de l'extraction des cires.

## V - ETUDE SPECTROSCOPIQUE

### 1°) Spectres U.V.

Le spectre ultraviolet des cires, enregistré sur un spectrophotomètre "Bausch et Lomb Spectronic 505", est pauvre en dépit de leur coloration. Examinée dans le n-hexane, la fraction des cires solubles dans ce solvant présente une absorption faible entre 270 et 330 nm (fig. 2).

### 2°) Spectres I.R.

Les échantillons sont examinés sous forme de pastilles de KBr et les spectres sont enregistrés sur un spectrographe "I.R. 457 Perkin-Elmer". Ces pastilles sont obtenues en comprimant sous une pression de 8 tonnes.cm<sup>-2</sup> un mélange de 3 mg de cire, de 300 mg de KBr homogénéisé préalablement en présence de 1 ml de CHCl<sub>3</sub>.

a) Le spectre IR de la cire brute (fig. 3a) présente les caractéristiques suivantes :

- Bande très large à 3420 cm<sup>-1</sup> : fonctions OH liées par liaison hydrogène (44).
- Bandes intenses à 2960, 2920 et 2850 cm<sup>-1</sup> dues aux groupements CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>.
- Bande à 1740 cm<sup>-1</sup> provenant du carboxyle d'esters aliphatiques.
- Bande à 1710 cm<sup>-1</sup> : carbonyle de fonction COOH.
- Bande faible et large vers 1640 cm<sup>-1</sup> provenant sans doute de doubles liaisons éthyléniques.

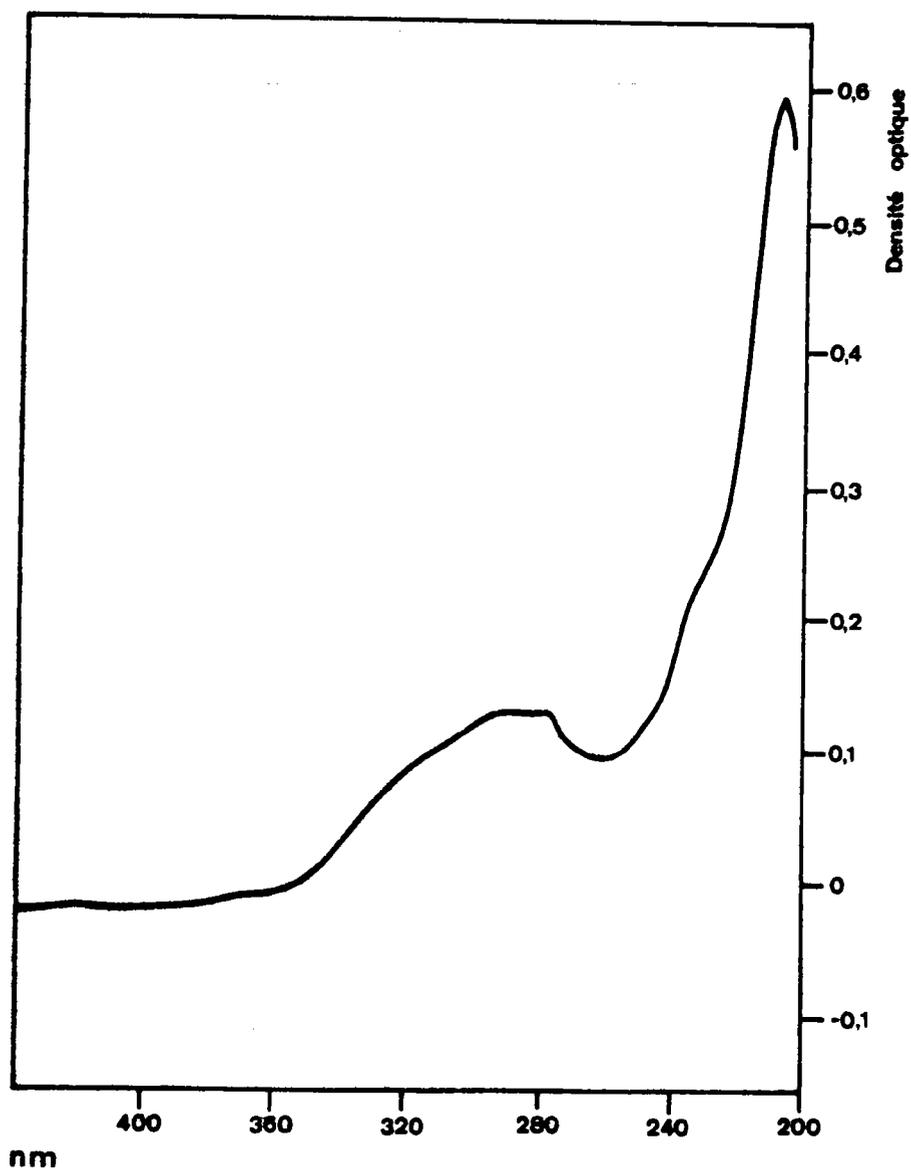


Fig. 2: Spectre UV de la cire brute. Solvant: n-hexane.

- 1460 et 1375  $\text{cm}^{-1}$  : bandes dues aux vibrations de déformation des groupements  $\text{CH}_2$  et  $\text{C-CH}_3$ .

- Bande large à 1260  $\text{cm}^{-1}$  que nous attribuons aux liaisons C-O et au mode de déformation des groupements OH.

- 720  $\text{cm}^{-1}$  : il s'agit d'une bande caractéristique d'un enchaînement  $(\text{CH}_2)_n$  avec  $n > 4$ .

Le spectre I.R. de la cire acide (fig. 3b) présente les mêmes caractéristiques, à l'exception, bien entendu, de la bande ester à 1740  $\text{cm}^{-1}$ .

b) La méthylation préalable de la cire acide conduit au déplacement de la bande à 1710  $\text{cm}^{-1}$  vers 1740  $\text{cm}^{-1}$  (transformation d'un carboxyle en ester aliphatique) et à l'apparition de bandes caractéristiques d'esters méthyliques à 1260, 1200 et 1170  $\text{cm}^{-1}$ . Une absorption persiste à 3420  $\text{cm}^{-1}$  (fig. 3c), indiquant peut-être une méthylation incomplète ou la présence de fonctions OH.

c) Spectre I.R. des sels de baryum (voir préparation annexe VII) : nous l'avons déterminé afin de vérifier l'existence de fonctions carboxyliques. Le spectre obtenu (fig. 3d) montre la disparition presque complète de la bande à 1710  $\text{cm}^{-1}$  et l'apparition d'une bande large à 1580  $\text{cm}^{-1}$  attribuée à l'ion  $\text{R-COO}^-$ .

L'examen de ces spectres suggère que notre cire acide est constituée par un mélange d'acides organiques à longue chaîne, peu ramifiés, certains d'entre eux pouvant être porteurs d'un ou plusieurs groupements hydroxyles.

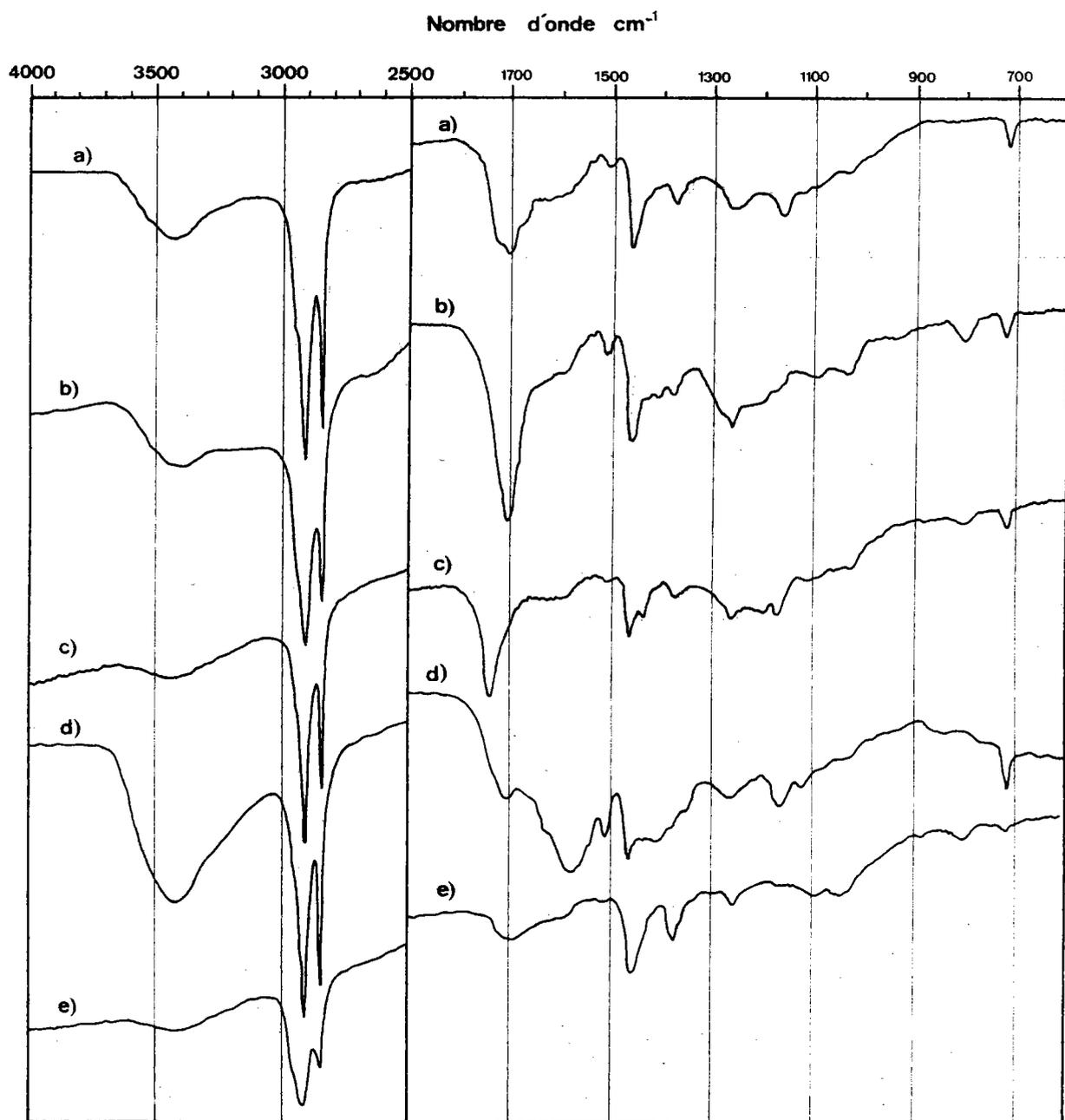


Fig. 3: Spectres IR. a: cire brute; b: cire acide; c: cire acide méthylée; d: cire acide, sel de Ba; e: insaponifiable.

d) Spectre I.R. de l'insaponifiable.

A part la quasi-absence d'absorption dans la région  $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ , le spectre I.R. de l'insaponifiable (fig. 3e), présente la même allure que les spectres précédents. Le mélange doit être constitué principalement de composés à longue chaîne, mono ou polyhydroxylés. Il n'est pas possible au vu de ce spectre, de mettre en évidence dans le mélange la présence de stérols.

3°) Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les déplacements chimiques  $\delta$  exprimés en ppm sont mesurés par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence. Les spectres RMN de la cire acide ou de l'insaponifiable (fig. 4a et 4b) confirment la structure  $-(\text{CH}_2)_n - \text{CH}_3$  (pic intense à 1,25 ppm et massif à 0,85 ppm). Le groupement  $-\text{CH}_2-\text{COO}-$  est responsable du massif observé vers 2,3 ppm dans les spectres de la cire acide (fig. 4a), du docosanoate de méthyle (fig. 5a) et de l'acide 12-hydroxystéarique (fig. 5b). Le massif à 3,7 ppm (fig. 4a et 4b) peut-être attribué aux atomes d'hydrogènes d'un carbone porteur d'une fonction alcool primaire ou secondaire (cf. fig. 5b).

En conclusion, les méthodes classiques d'analyse, ou l'étude spectrographique de notre cire, avant ou après saponification, ne nous fournissent que peu de renseignements : il s'agit probablement de composés à longue chaîne aliphatique, peu ramifiée, comportant des groupements carboxyliques et hydroxylés, et peut-être une double liaison.

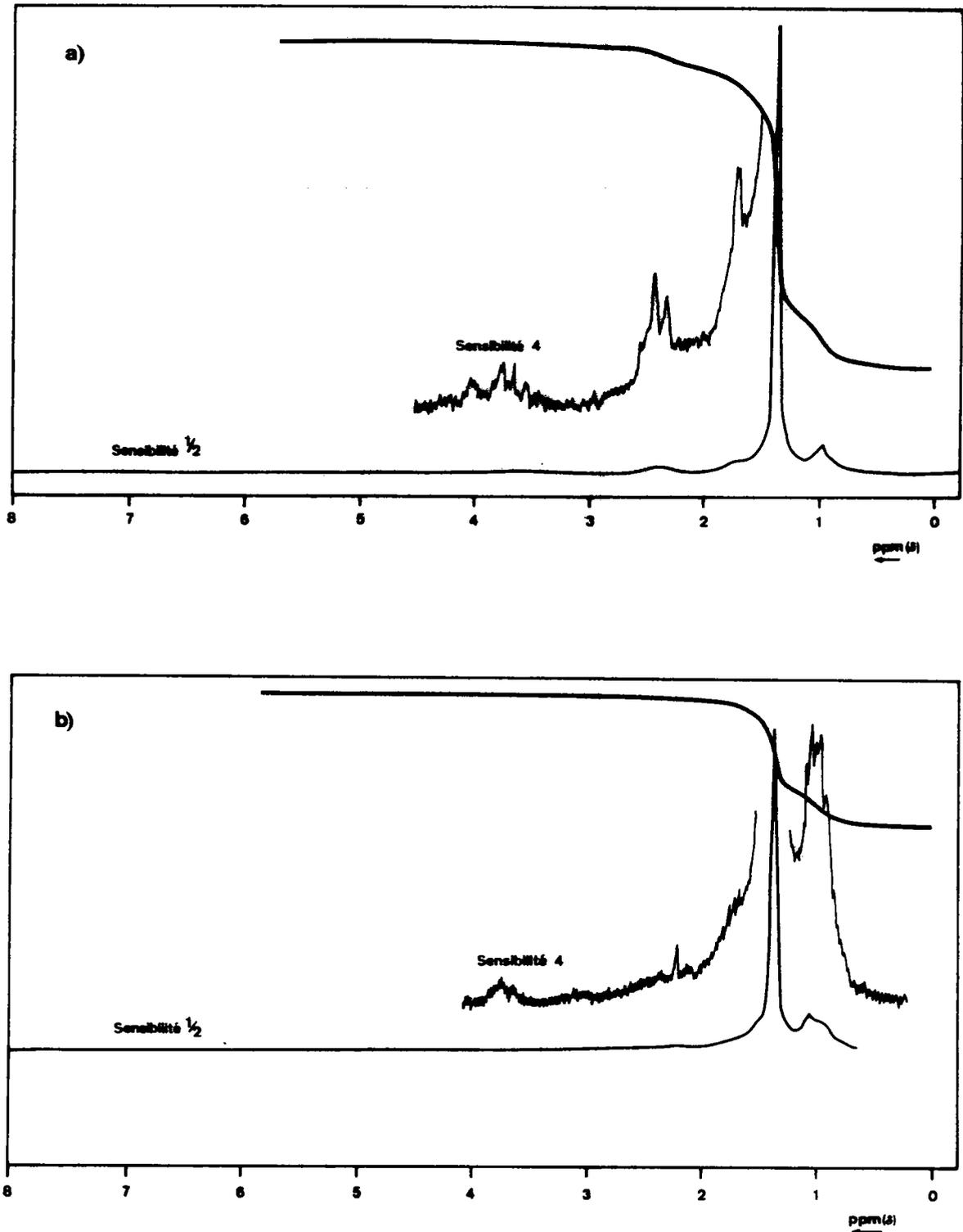


Fig. 4: Spectres RMN. a: cire acide; b: insaponifiable.

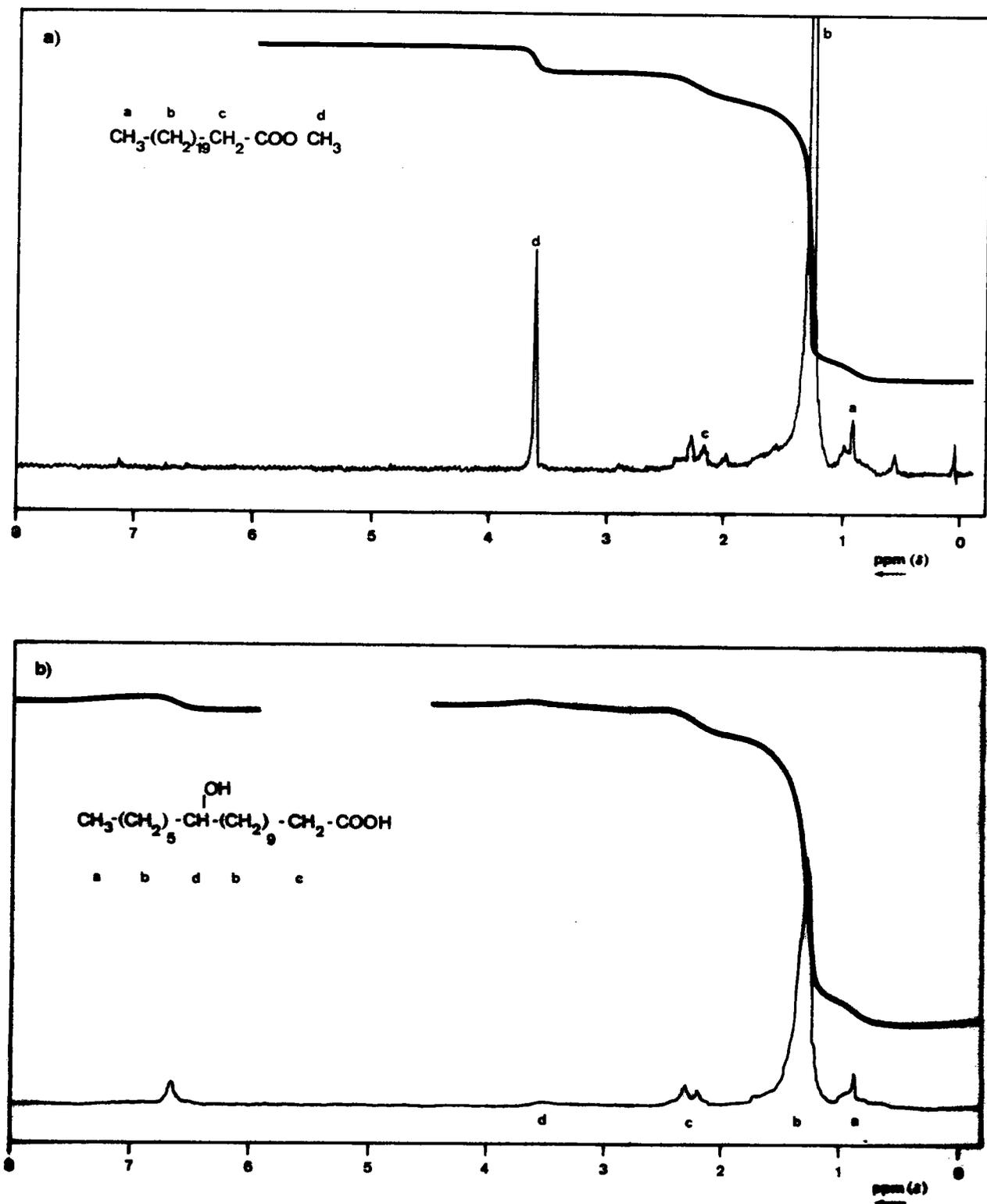


Fig. 5: Spectres RMN. a: docosanoate de méthyle; b: acide 12-hydroxy-stéarique.

CHAPITRE III

## ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA CIRE ACIDE .

## IDENTIFICATION D'ACIDES GRAS .

La fraction saponifiable des cires, représentant environ les trois-quarts de la cire brute, a retenu plus particulièrement notre attention et, dans la suite du présent exposé, il sera exclusivement question des cires présentant un caractère acide après saponification et séparation de l'insaponifiable. Nous dirons quelques mots sur la présence d'alcools gras dans l'insaponifiable en fin du § I de ce chapitre.

I - IDENTIFICATION D'ACIDES GRAS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE (CPV)1°) Généralités.

Les acides gras, initialement chromatographiés sans transformation chimique préalable par JAMES et MARTIN en 1952 (45), sont généralement étudiés sous formes d'esters méthyliques, afin d'obtenir des pics plus symétriques et d'augmenter la volatilité des termes les plus lourds. De très nombreux travaux, qu'on trouvera résumés par BURCHFIELD et STORRS (46), ont été consacrés à la séparation des esters méthyliques d'acides gras saturés ou insaturés. BERTHUIS (47), par exemple, sépare les esters méthyliques des acides de  $C_{20}$  à  $C_{30}$ , en utilisant une phase stationnaire apolaire, l'Apiézon L. Dans les conditions utilisées, le triacontanoate de méthyle est élué au bout d'environ 110 minutes. KHAN et WHITHAM (48) obtiennent à  $295^{\circ}C$  l'élution du terme en  $C_{34}$  au bout de 75 minutes, à

l'aide d'une colonne chargée d'une graisse de silicone (taux d'imprégnation 40 %). MORRISSON et BICK (26) utilisent un mélange de silicone SE-52 et de Carbowax 20 M (2 % et 0,2 % respectivement sur célite) à 250°C pour la séparation des esters méthyliques de  $C_{18}$  à  $C_{34}$ . IKAN et coll. (2) chromatographient les esters des acides de  $C_{12}$  à  $C_{26}$  sur une colonne apolaire (Apiézon L, 10 % sur célite) et sur une colonne polaire (D E G S, 15 % chromosorb W.A.W.). SCHNITZER et OGNER (37), à l'aide d'une colonne contenant 2,5 % de silicone SE-30 sur chromosorb W HMDS, réalisent la séparation des acides de  $C_{16}$  à  $C_{36}$ .

Pour notre part, après avoir essayé plusieurs phases stationnaires (SE-30, SE-52, Apiézon L, OV-17) avec différents taux d'imprégnation, nous avons porté notre choix sur la silicone OV-17. Cette phase stationnaire permet d'obtenir de très bons chromatogrammes, aussi bien pour les esters méthyliques d'acides gras que pour les acétates d'alcools gras ou les n-alcanes à longue chaîne.

Il est possible, avec le faible taux d'imprégnation utilisé (2,5 %) d'obtenir en moins d'une heure, en programmation de température, la séparation des termes de  $C_{14}$  à  $C_{34}$  (voir ci-dessous fig. 10). En opération isotherme, le tétratriacontanoate de méthyle peut être élué au bout d'environ 25 minutes à 280°C (voir ci-dessous fig. 8).

## 2°) Analyse par CPV à température de colonne constante

Après avoir méthylé la cire (voir annexe IV) nous avons cherché à isoler et à identifier par CPV les acides organiques les plus simples, c'est-à-dire les acides gras normaux.

a) Principe

Pour une colonne donnée et une température choisie, le logarithme des temps de rétention vrais  $t_n - t_M$ , relatifs au temps de rétention vrai d'un soluté choisi comme référence, est lié linéairement au nombre  $n$  d'atomes de carbone dans une même série homologue (esters méthyliques d'acides gras normaux, acétates d'alcools gras normaux, n-alcanes, etc...) à partir du terme en  $C_5$ .

$$n = m \log \frac{t_n - t_M}{t_o - t_M} + n_o \quad (1)$$

$t_n$  : temps de rétention du terme de la série ayant  $n$  atomes de carbone.

$t_o$  : temps de rétention d'un composé choisi comme référence.

$t_M$  : temps mort de l'ensemble injecteur-colonne détecteur.

$m$  et  $n_o$  : constantes.

Le temps mort est déterminé par l'intervalle de temps séparant l'injection et la sortie du pic de l'air. Le détecteur à ionisation de flamme n'étant pas sensible à l'air, il est nécessaire de déterminer  $t_M$  par un artifice de calcul. Nous avons utilisé la méthode de GOLD (49). Pour trois esters méthyliques d'acides gras normaux ayant  $n_1$ ,  $n_2$  et  $n_3$  atomes de carbone, et des temps de rétention  $t_1$ ,  $t_2$  et  $t_3$ , on déduit de l'expression (1) les relations :

$$m = \frac{n_3 - n_1}{\log \frac{t_3 - t_M}{t_1 - t_M}} \quad (2)$$

$$t_M = \frac{t_2 - t_1 \cdot 10^{(n_2 - n_1)/m}}{1 - 10^{(n_2 - n_1)/m}} \quad (3)$$

La résolution des équations (2) et (3) est effectuée par approximations successives.

b) Conditions expérimentales

- Chromatographe "Perkin-Elmer F 30" muni de deux colonnes et deux détecteurs à ionisation de flamme.
- Températures de l'injecteur et de détection : 300°C.
- Température de colonne : 200°C et 280°C.
- Gaz vecteur : N<sub>2</sub> ; débit : 20 ml par minute.
- Pression d'air : 170 kN/m<sup>2</sup>.
- Pression d'hydrogène : 125 kN/m<sup>2</sup>.
- Colonnes en verre : Longueur : 6 pieds ; diamètre externe : 1/4 de pouce ; phase stationnaire : OV-17, 2,5 % sur chromosorb G AW DMCS, 80-100 mesh.

c) Résultats

La fig. 6 reproduit le chromatogramme obtenu avec notre échantillon à 200°C. Le temps de rétention de référence  $t_0$  est le temps de rétention du pentadécanoate de méthyle, introduit préalablement dans notre échantillon. Le temps mort à 200°C, déterminé par la méthode de GOLD (49), à partir des données d'un chromatogramme témoin des esters méthyliques des acides en C<sub>15</sub>, C<sub>16</sub> et C<sub>22</sub>, est de 0,76 minute. Nous avons tracé la droite de référence (fig. 7) :  $\log \frac{t_n - t_M}{t_0 - t_M} = an + b$  (points noirs). Les petits cercles représentent les valeurs de  $\log \frac{t_n - t_M}{t_0 - t_M}$  en fonction du nombre d'atomes de carbone  $n^*$  supposé pour chaque pic (voir tableau III).

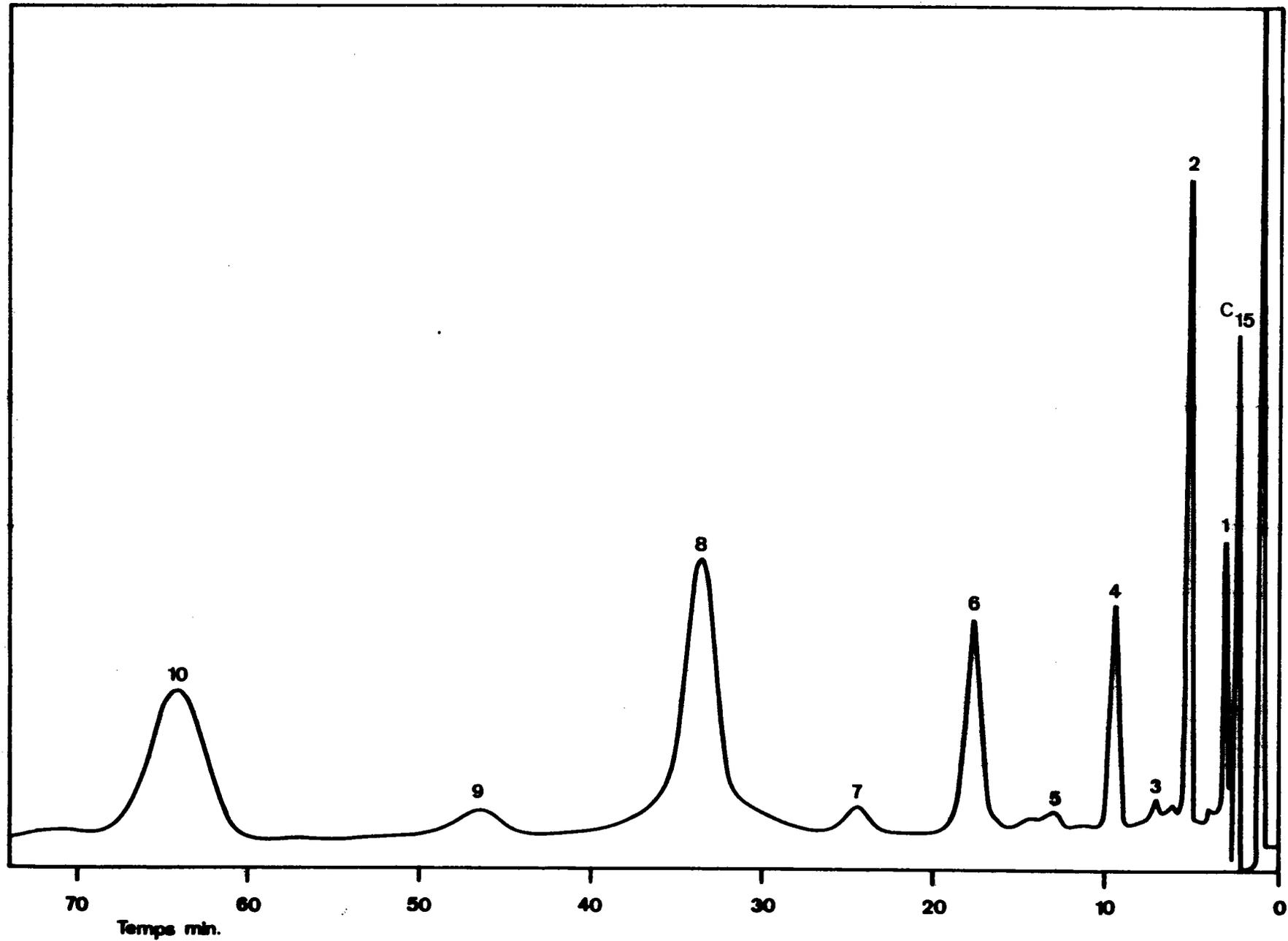


Fig. 6: CPV à 200°C des esters méthyliques de la cire acide.

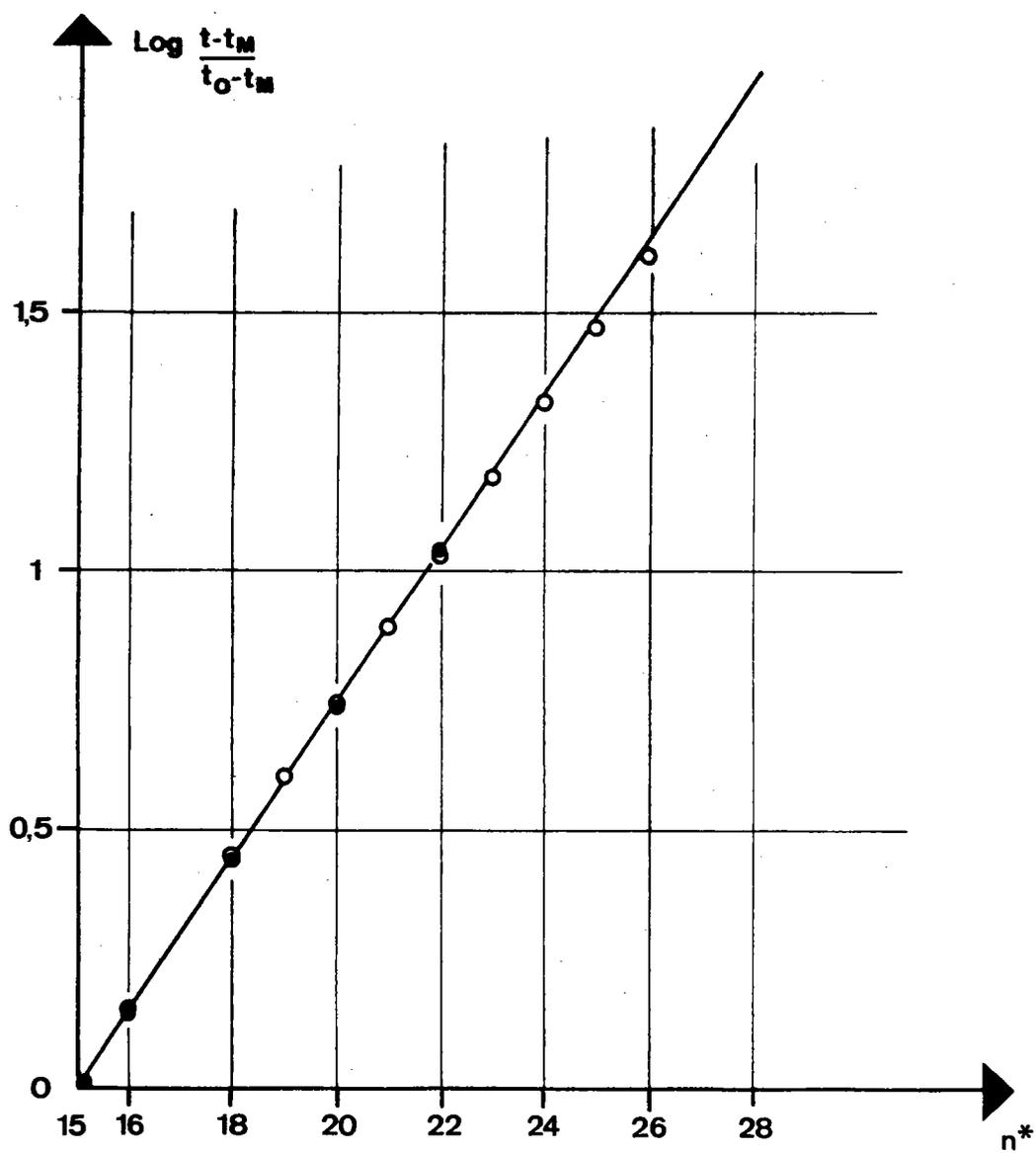


Fig. 7: Courbe  $\log \frac{t_n - t_M}{t_0 - t_M} \approx f(n^*)$  obtenue à 200°C.

Chromatogramme témoin			Chromatogramme échantillon			
n	t <sub>n</sub> min	$\log \frac{t_n - t_n}{t_o - t_M}$	Pic	n*	t	$\log \frac{t - t_M}{t_o - t_M}$
15	2,35	0	C <sub>15</sub>		2,33	0
16	3,0	0,149	1	16	3,03	0,150
18	5,2	0,446	2	18	5,18	0,448
			3	19	7,03	0,603
20	9,5	0,740	4	20	9,45	0,744
			5	21	13,0	0,893
22	18,0	1,035	6	22	17,7	1,034
			7	23	24,5	1,180
			8	24	33,6	1,322
			9	25	46,7	1,467
			10	26	64,3	1,608

Tableau III : Résultats de l'analyse par CPV à 200°C d'un mélange témoin et d'un échantillon de cire.

On remarque que ces cercles se placent sur la droite de référence. De cette manière, on identifie donc les esters méthyliques des acides de  $C_{16}$  à  $C_{26}$ .

Le temps de rétention du terme en  $C_{26}$  dépasse une heure à  $200^{\circ}\text{C}$ . Pour identifier les termes supérieurs, il est nécessaire de diminuer leurs temps de rétention. Pour cela, nous avons effectué une analyse à  $280^{\circ}\text{C}$  (voir fig. 8), les autres conditions chromatographiques restant inchangées. Le temps de rétention du pentadécanoate de méthyle étant trop faible dans ces conditions pour être mesuré avec une précision suffisante, nous avons choisi le terme en  $C_{20}$  comme référence. Le temps mort à  $280^{\circ}\text{C}$ , calculé d'après les temps de rétention des termes en  $C_{20}$ ,  $C_{22}$  et  $C_{30}$  vaut 1,03 minute. Les valeurs de  $\log \frac{t_n - t_M}{t_o - t_M}$  obtenues à  $280^{\circ}\text{C}$  (voir tableau IV) se placent comme précédemment en fonction de  $n^*$  (petits cercles) sur la droite de référence (points noirs) (voir fig. 9).

#### d) Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de mettre en évidence dans notre échantillon la présence d'acides gras ayant de 16 à 34 atomes de carbone. On remarque (fig. 6 et fig. 8) la prépondérance des acides à nombre pair d'atomes de carbone. La structure linéaire de ces acides sera confirmée plus loin par spectrométrie de masse.

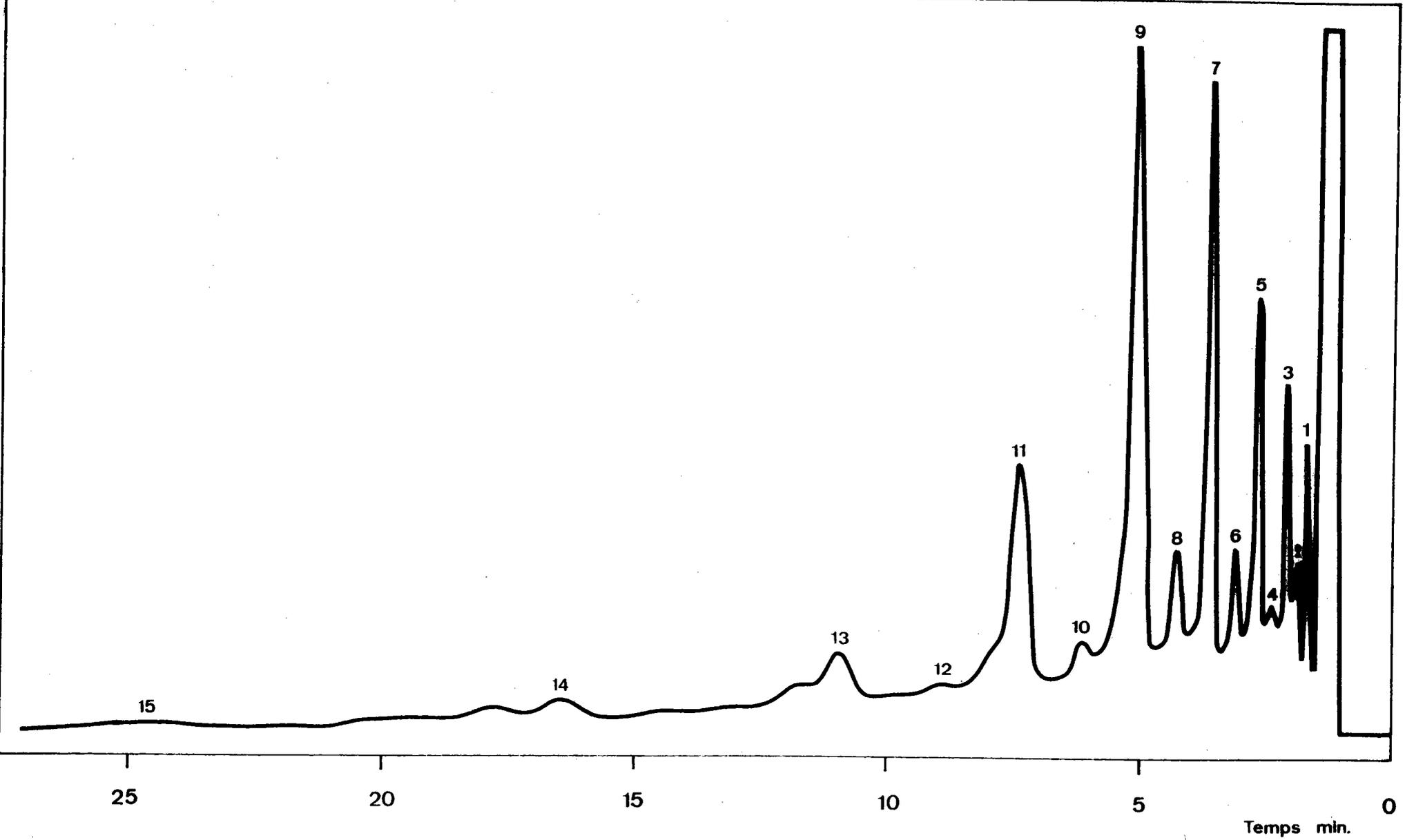


Fig. 8: CPV à 280°C des esters méthyliques de la cire acide.

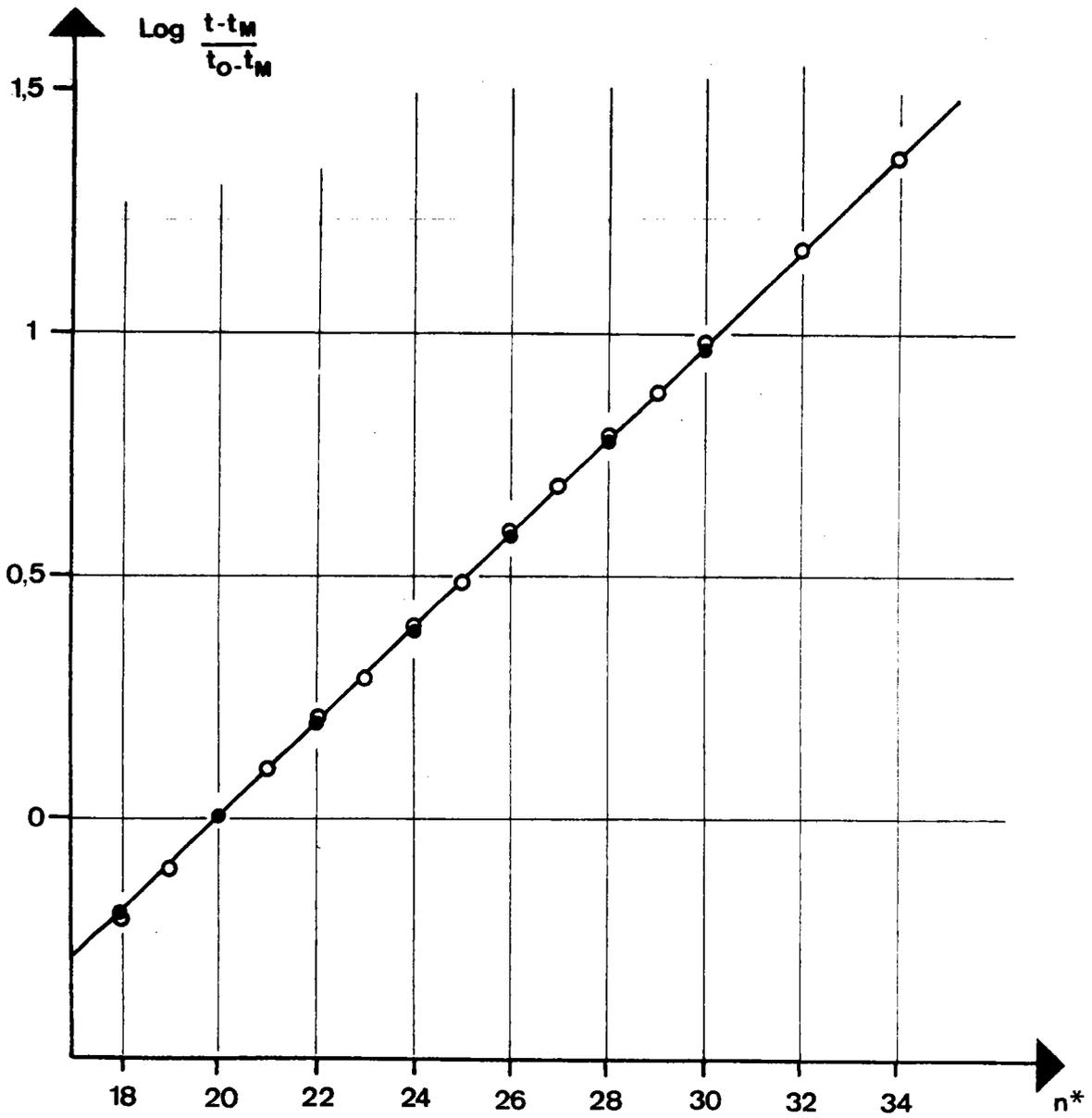


Fig. 9: Courbe  $\log \frac{t_n - t_M}{t_0 - t_M} = f(n^*)$  obtenue à 280°C.

Chromatogramme témoin			Chromatogramme échantillon			
n	$t_{\min}^n$	$\log \frac{t_n - t_n}{t_o - t_M}$	Pic	n*	t	$\log \frac{t - t_M}{t_o - t_M}$
18	1,73	1,812	1	18	1,7	1,806
			2	19	1,85	1,894
20	2,1	0	3	20	2,08	0
			4	21	2,35	0,102
22	2,7	0,193	5	22	2,68	0,197
			6	23	3,05	0,286
24	3,63	0,384	7	24	3,58	0,386
			8	25	4,23	0,486
26	5,08	0,577	9	26	5,03	0,582
			10	27	6,05	0,682
28	7,4	0,775	11	28	7,35	0,782
			12	29	8,9	0,875
30	11,0	0,969	13	30	10,95	0,977
			14	32	16,5	1,170
			15	34	24,9	1,359

TABLEAU IV : Résultats de l'analyse par CPV à 280°C d'un mélange témoin et d'un échantillon de cire.

### 3°) Analyse quantitative des acides gras

#### a) Nécessité d'une programmation de température.

Pour effectuer l'analyse quantitative par CPV des acides gras présents dans la cire, nous avons préféré opérer en programmation linéaire de température de 140°C à 200°C, à raison de 4°C par minute, les autres conditions chromatographiques restant inchangées. Cette opération permet de déceler les composés qui seraient rapidement élués à 200°C et masqués par le pic du solvant. D'autre part, elle permet d'obtenir des pics à peu près régulièrement espacés et de largeurs équivalentes. Ceci facilite en particulier la détermination des aires des pics des composés les plus lents à émerger de la colonne. En effet, à température de colonne constante, à surface égale, la largeur des pics augmente avec le temps de rétention tandis que leur hauteur diminue.

#### b) Principe de l'analyse quantitative (50)

La masse  $m_i$  de chaque soluté du mélange est proportionnelle à l'aire  $S_i$  du pic correspondant :

$$m_i = K_i S_i$$

La détermination absolue des  $K_i$  est toujours très délicate. Pour lever cette difficulté, on incorpore dans l'échantillon à analyser une masse  $m_E$  de substance étalon, n'interférant pas avec les autres composés. On peut introduire un coefficient relatif,

$$k_i = \frac{K_i}{K_E} = \frac{m_i}{m_E} \times \frac{S_E}{S_i}$$

Pour déterminer les coefficients  $k_i$ , on réalise un mélange étalon de composition voisine de celle du mélange à analyser et contenant une masse  $m_E$  de substance étalon.

Lorsque les composés et l'étalon appartiennent à une même série homologue, on admet généralement  $k_i = 1$ . Dans ces conditions, la proportion en % du constituant  $i$  dans le mélange est obtenu par l'expression :

$$a_i = \frac{100 m_i}{m} = \frac{S_i}{S_E} \times \frac{m_E \times 100}{m}$$

où  $m$  représente la masse totale de cire.

La proportion du constituant  $i$  par rapport aux esters totaux élués est donnée par :

$$b_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \times 100$$

### c) Etalonnage

Nous avons par précaution réalisé un mélange étalon d'esters méthyliques d'acides gras normaux, afin de vérifier la validité de  $k_i = 1$ . La substance de référence est le pentadécanoate de méthyle. L'intégration des différents pics est effectuée par découpage du chromatogramme et pesée du papier. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau (V).

n	$m_i$ en mg	poids du pic en mg	$m_i^*$	$k_i$	$\frac{\Delta m_i^*}{m_i}$
15	13,71	48,1		1	
16	1,27	4,45	1,27	1,00	< 1 %
18	5,77	19,39	5,53	1,04	4,2 %
20	2,00	7,16	2,04	0,98	2 %
22	4,59	17,06	4,86	0,94	5,9 %
24	8,93	29,33	8,36	1,07	6,4 %
26	9,07	33,74	9,62	0,94	6,1 %
28	4,09	14,17	4,04	1,01	1,2 %

TABLEAU V : Résultats de l'étalonnage d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras.

Le chromatogramme est obtenu par injection de 1  $\mu$ l de mélange contenant  $m_i$  mg d'ester dans environ 10 ml de chloroforme. Dans la colonne  $m_i^*$ , nous donnons la composition du mélange calculée d'après

$$m_i^* = \frac{S_i}{S_E} \times m_E, \text{ c'est-à-dire en supposant } k_i = 1.$$

L'écart relatif  $\frac{\Delta m_i^*}{m_i}$  avec le poids réel du composé  $i$  dans le mélange ne dépasse pas 7 %. De même l'écart de  $k_i$  avec l'unité ne dépasse pas 7 %.

Nous admettons donc  $k_i = 1$  pour l'analyse de la cire.

d) Analyse quantitative de la cire

Après avoir dissous dans environ 2 ml de  $\text{CHCl}_3$  41,44 mg de cire méthylée et  $m_E = 2,91$  mg de pentadécanoate de méthyle (qui ne se trouve qu'en très faible proportion dans la cire), on injecte 1  $\mu\text{l}$  du mélange obtenu. Le chromatogramme obtenu est reproduit fig. 10, les résultats sont exposés dans le tableau VI.

Ces résultats démontrent une prépondérance des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone. Ceux-ci représentent 83,1 % des composés élués, tandis que les acides à nombre impair d'atomes de carbone ne représentent que 7,3 %. Les acides les plus abondants sont les acides tétracosanoïque et hexacosanoïque. La répartition trouvée rejoint les résultats obtenus par d'autres auteurs à partir d'autres échantillons de cire, en particulier MORRISSON et BICK (26), IVANOVA (28), SCHNITZER et OGNER (37) et KHAN et SCHNITZER (38), précédemment cités (voir chap. I).

Les acides gras constituent 21,4 % de la cire. Les substances restantes sont insuffisamment volatiles pour être analysées par CPV même après acétylation par l'anhydride acétique d'éventuels groupements -OH. Nous avons d'ailleurs remarqué qu'elles se déposent dans le conduit en verre dont est pourvu l'injecteur du chromatographe.

La proportion d'acides gras dans l'acide humique est donc de l'ordre de 1,1 % et de 0,4 % dans la tourbe. Les cires obtenues après oxydation peracétique de HHm ne contiennent pas d'acides gras, ni d'autres substances identifiables par CPV.

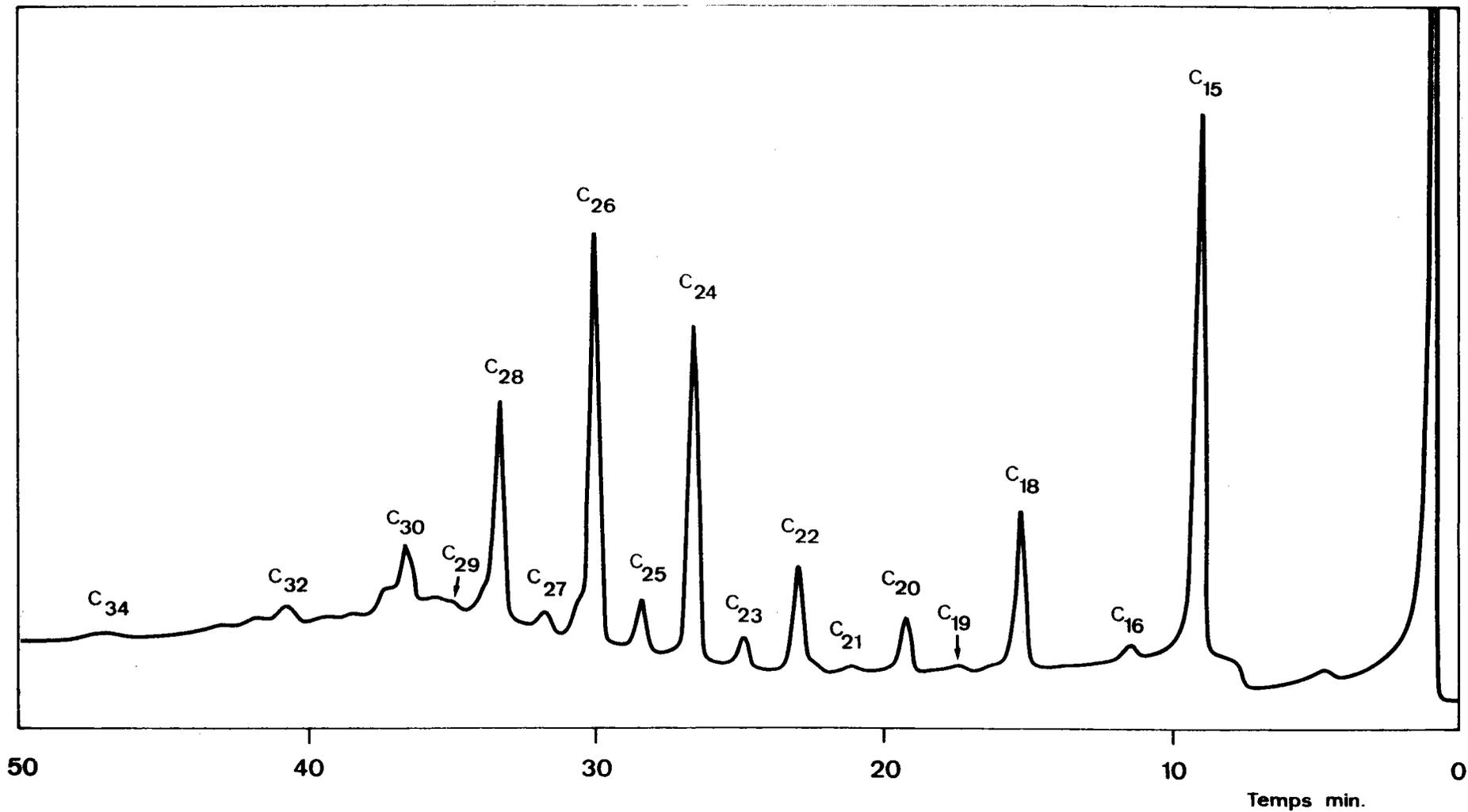


Fig. 10: CPV des esters méthyliques de la cire acide en programmation linéaire de température de 140° à 280°, à raison de 4° par minute.

n	Poids du pic mg	ai %	bi %	n	Poids du pic mg	ai %	bi %
16	1,38	0,25	1,10	26	31,98	5,90	24,95
17	-	-	-	27	1,50	0,30	1,15
18	11,65	2,15	9,10	28	16,68	3,10	13,00
19	0,49	0,10	0,40	29	0,74	0,15	0,55
20	3,93	0,70	3,05	30	5,05	0,95	3,95
21	0,77	0,15	0,60	31	0,26	0,05	0,20
22	7,52	1,40	5,85	32	2,69	0,50	2,10
23	2,25	0,40	1,75	34	1,01	0,20	0,80
24	24,60	4,55	19,20	non identifiés	12,31	2,25	9,60
25	3,42	0,65	2,65	TOTAL	128,23	23,7	100

TABLEAU VI : Analyse quantitative de la cire.

Pic de référence C<sub>15</sub> : 38,02 mg)

#### 4°) Identification d'alcools gras dans l'insaponifiable

L'analyse chromatographique de l'insaponifiable, acétylé ou non par l'anhydride acétique, nous a permis de la même manière d'identifier des alcools gras normaux de C<sub>16</sub> à C<sub>30</sub> parmi d'autres substances. L'ensemble des substances identifiées ne représente guère plus de 15 % de l'insapo-

nifiable. La répartition des alcools gras en fonction du nombre d'atomes de carbone est analogue à celle des acides gras (prépondérance des alcools gras en C<sub>24</sub> et C<sub>26</sub>). Signalons d'autre part l'absence d'hydrocarbures. Comme la cire acide, l'insaponifiable contient donc une majorité de substances trop polaires ou trop peu volatiles pour être identifiées par CPV. La proportion d'alcools gras dans nos cires est nettement inférieure à la proportion d'acides gras et les cérides vrais ne constituent donc qu'une faible partie des cires brutes.

## II - CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION DE LA CIRE SUR GEL DE SILICE

Afin de débarrasser la cire des acides gras identifiables par CPV et de permettre une identification plus facile des autres constituants, nous avons effectué une séparation de la cire, en plusieurs groupes de substances, par chromatographie sur colonne de gel de silice.

### 1°) Mode opératoire

Nous chromatographions environ 500 mg de cire méthylée, dissoute dans quelques ml de benzène, sur une colonne de 2,5 cm de diamètre contenant 100 g de "Kieselgel Merck", 0,05 - 0,2 mm.

L'élution est effectuée successivement par :

- 600 ml de benzène : éluat A.
- 1100 ml de chloroforme : éluat B.
- 250 ml d'éther éthylique : éluat C.
- 500 ml de méthanol : éluat D.
- 100 ml d'un mélange acide acétique-méthanol-éther éthylique (60-20-20) : éluat E.

- 100 ml d'un mélange pyridine-chloroforme (60-40) : éluat F.

Après évaporation du solvant, les différents éluats sont repris par du benzène et filtrés sur "Millipore" de diamètre 25 m $\mu$ , afin d'éliminer les très fines particules de gel de silice qui sont entraînées au cours de l'élution.

## 2°) Résultats

Le tableau VII donne les rendements des différents éluats, leur masse molaire moyenne en nombre déterminée par tonométrie et leur composition centésimale. La figure 11 représente les spectres IR des différentes fractions.

Les pertes et les substances adsorbées irréversiblement sur la colonne ne dépassent pas 1 % de la masse initialement mise en jeu.

Fraction	Rendement %	Composition %, 0 par différence				Masse Molaire
		C	H	N	O	
A	25,0	77,9	12,5	-	9,6	420
B	44,6	73,2	11,2	-	15,6	460
C	8,5	70,1	9,4	traces	20,5	710
D	14,8	66,4	8,4	-	25,2	1250
E	4,4	66,1	9,6	traces	24,3	1325
F	1,9	65,7	9,1	traces	25,2	
TOTAL	99,2					

TABLEAU VII : Résultats du fractionnement de la cire sur colonne de gel de silice.

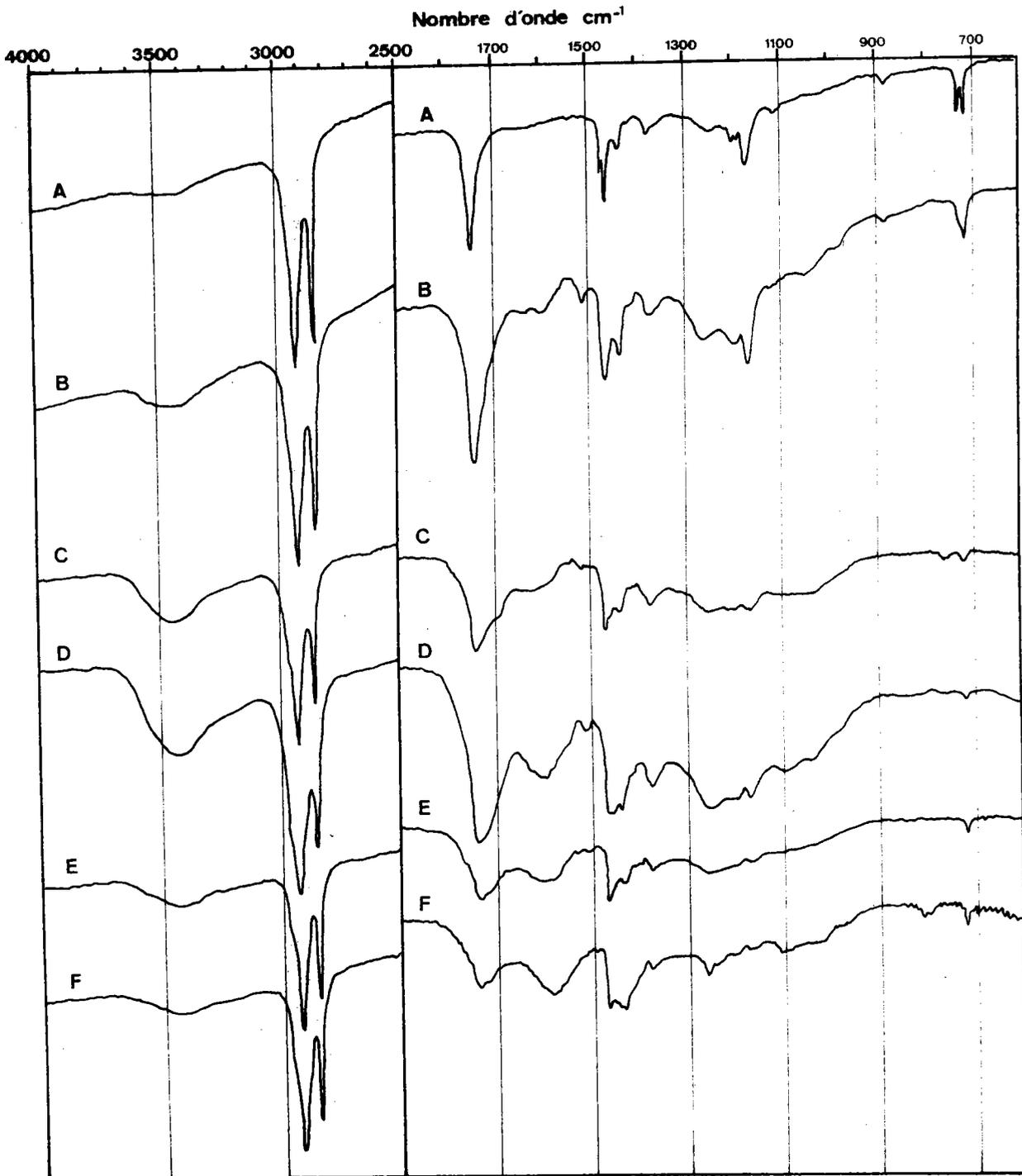


Fig. 11: Spectres IR des différents éluats obtenus par chromatographie sur gel de silice de la cire acide méthylée.

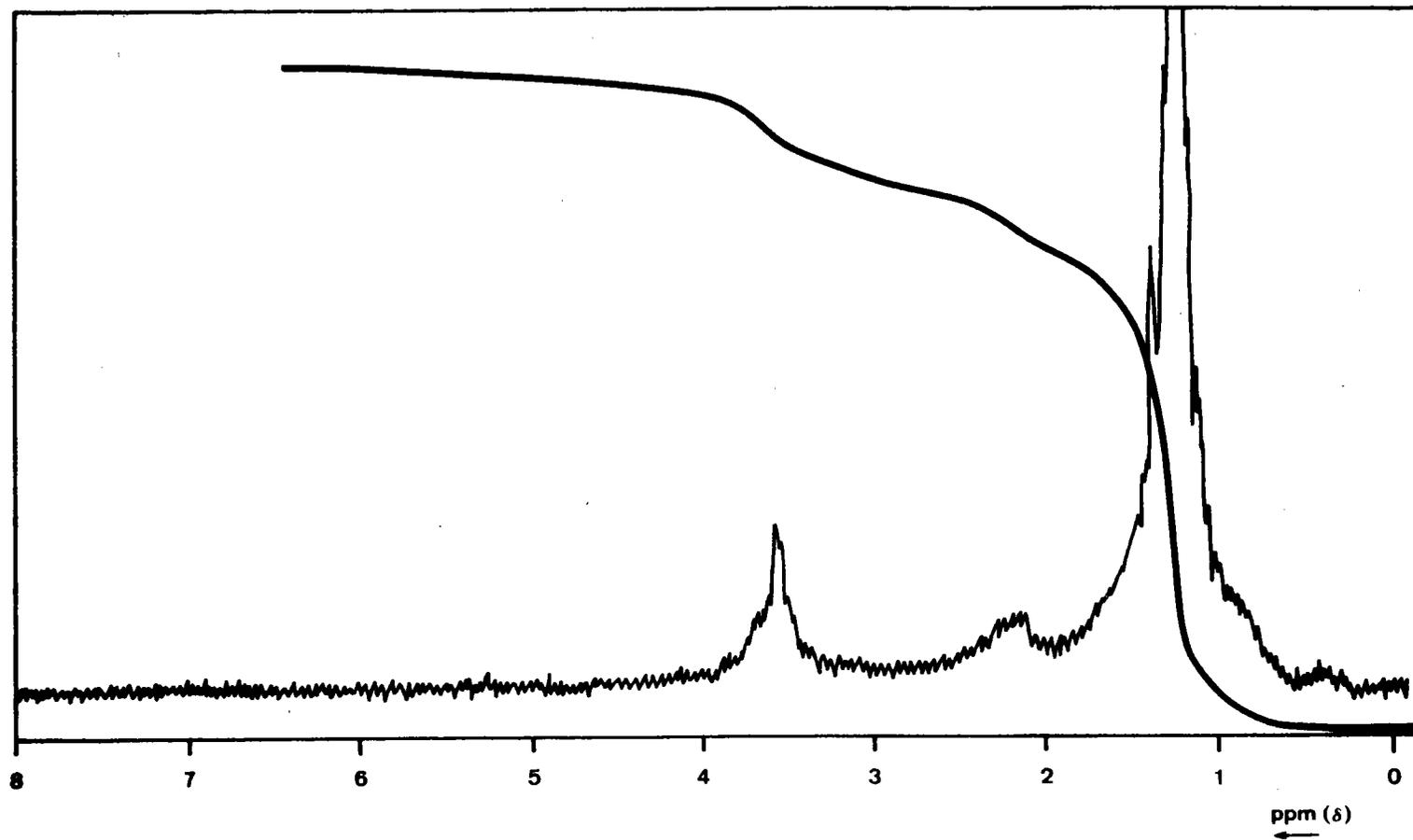


Fig. 12: Spectre RMN de l'éluat B obtenu par chromatographie sur colonne de gel de silice.

La polarité croissante des éluants doit fournir des fractions de plus en plus polaires et l'on doit retrouver dans la fraction A les composés les moins polaires, c'est-à-dire les esters méthyliques des acides gras précédemment décrits. L'analyse qualitative et quantitative par CPV montre qu'on retrouve effectivement dans la fraction A tous les composés précédemment révélés par CPV et qu'ils constituent la quasi-totalité de cette fraction. Ceci est confirmé par le rendement en éluat A (25 %) comparé aux résultats de l'analyse quantitative par CPV (23,7 % de substances éluées), la masse molaire moyenne (420), ainsi que par le rapport carbone/hydrogène (6,2 contre 6 pour un ester méthylique d'acide gras saturé).

La fraction B (pratiquement 45 % de la cire acide) contient très peu de substances volatiles en CPV, les autres n'en contiennent pas du tout. Pourtant, le spectre infra-rouge de l'éluat B diffère très peu de celui de la fraction A, si ce n'est l'absorption à 3450  $\text{cm}^{-1}$  attribuable à des groupements hydroxyles. De même, la masse molaire est à peine plus élevée.

Le spectre RMN (fig. 12) présente la structure  $-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ , quoique le massif à 0,85 ppm ne soit pas très net. Les autres caractéristiques sont : le massif vers 2,3 ppm ( $-\text{CH}_2-\text{COO}$ ) ; le pic à 3,7 ppm ( $-\text{COOCH}_3$ ) auquel semble se superposer un massif attribuable à des protons du type  $-\text{CH}(\text{OH})-$  (cf spectres 5a et 5b).

La composition centésimale de la fraction B est très voisine de la composition d'une molécule moyenne contenant 25 atomes de carbone (la longueur de chaîne moyenne des acides gras est de 24), 4 atomes d'oxygène (dont le groupement  $-\text{COOCH}_3$ ) et deux sites d'insaturation supplémentaires

(soit  $C_{23}H_{43}O_2-COOCH_3$ ,  $M = 410$ ) : C : 73,17 % ; H : 11,22 % ; O : 15,61 %.

Par dosage acidimétrique (voir chap. II, § III, 5), nous avons vérifié que l'acidité résiduelle de l'éluat B est nulle, compte tenu des incertitudes expérimentales et que la méthylation des fonctions COOH est complète. Une nouvelle saponification de cet éluat, suivie d'une méthylation et d'une analyse par CPV, montre qu'il n'y a pas d'acides gras supplémentaires libérés.

La non-volatilité des composés de la fraction B peut être attribuée à la présence de fonctions oxygénées, comme en témoigne la composition centésimale. Ces molécules présentent une structure plus complexe que celle d'un acide mono-alcool ou d'un diacide saturé, puisque nous avons pu chromatographier aisément, comme témoins, les esters méthyliques des acides monohydroxylés en  $C_{16}$  et  $C_{18}$ , ainsi que le diacide en  $C_{22}$ . Il est possible également que les composés de la fraction B, très sensibles à la chaleur, se polymérisent facilement dans l'injecteur du chromatographe. En effet, les substances noircies, déposées dans le conduit en verre dont est pourvu l'injecteur, ne se redissolvent pas dans le chloroforme bouillant.

Dans les fractions suivantes (C,D,E,F), le taux d'oxygène augmente en même temps que la masse molaire. L'insaturation semble également augmenter, comme le montre l'absorption IR de plus en plus nette entre 1550 et  $1650\text{ cm}^{-1}$  (fig. 11).

### III - CONCLUSION

L'analyse par CPV de la cire acide nous a permis d'identifier des acides gras normaux de  $C_{16}$  à  $C_{34}$ , qui constituent environ 22 % de la cire acide et de détecter dans l'insaponifiable de petites quantités d'alcools

gras de C<sub>16</sub> à C<sub>30</sub>.

Par chromatographie sur colonne de gel de silice, nous avons réussi à séparer les constituants de la cire acide en six groupes de substances, le premier d'entre eux contenant les acides gras identifiés par CPV.

CHAPITRE IVIDENTIFICATION DES CONSTITUANTS DES CIRES PAR  
UTILISATION COUPLEE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN  
PHASE GAZEUSE ET DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

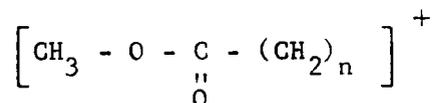
(C P V - S M)

Afin de vérifier la structure des acides gras identifiés par CPV, nous avons étudié les spectres de masse correspondant aux différents pics chromatographiques. Ces spectres ont été effectués, sous 70 eV, par le centre de spectrométrie de masse de la Faculté des Sciences de Strasbourg.

I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA FRAGMENTATION DES ESTERS METHYLIQUES D'ACIDES GRAS EN SPECTROMETRIE DE MASSE.

Les spectres de masse des esters méthyliques à longue chaîne sont bien connus depuis les travaux de RYHAGE et STENHAGEN (51).

Les pics les plus importants dans le spectre de masse (70 eV) des esters méthyliques d'acides gras saturés linéaires (51, 52) sont dus à des ions contenant de l'oxygène :

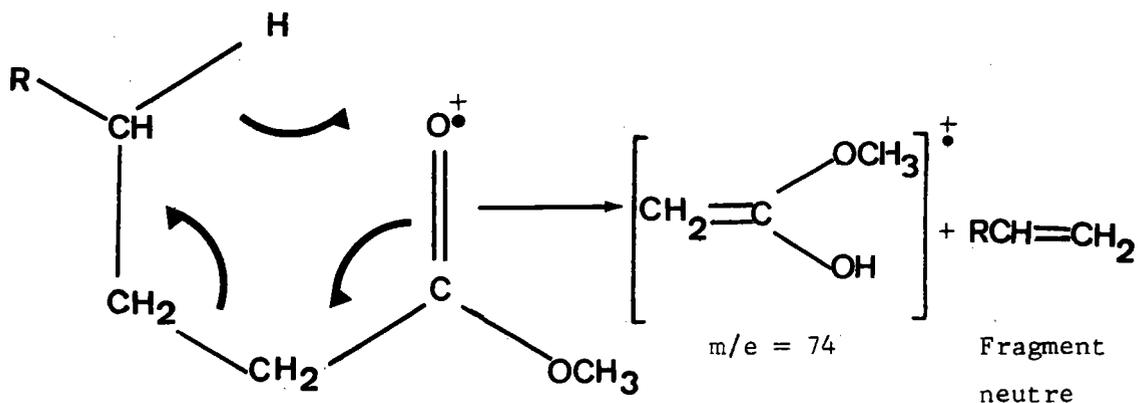


appartenant à la série  $m/e = 59 + 14 n$ , en particulier :

$$m/e = 87 (n = 2), 143 (n = 6), M - 43, M - 29,$$

les deux derniers provenant de la perte de  $(\text{CH}_2)_3 + \text{H}$  et de  $(\text{CH}_2)_2 + \text{H}$  respectivement.

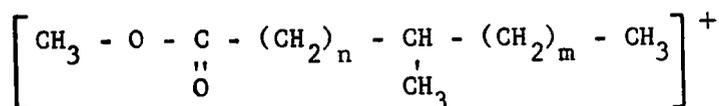
D'autre part, le pic de base,  $m/e = 74$ , provient d'un réarrangement de Mac LAFFERTY suivant le schéma :



Les autres ions importants sont :

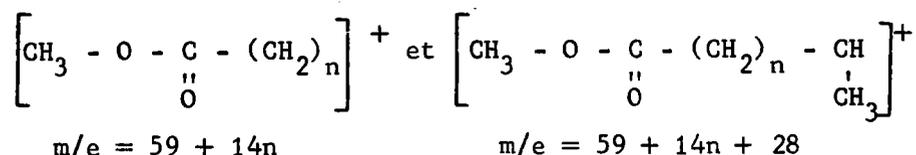
- l'ion moléculaire  $m/e = M$  ;
- l'ion  $m/e = M - 31$  ,  $\left[ \begin{array}{c} - C - (CH_2)_n - CH_3 \\ || \\ O \end{array} \right]^+$  correspondant à la perte du méthoxyle ;
- les ions correspondant à des fragments alkyles  $C_n H_{2n+1}$  et  $C_n H_{2n-1}$  , abondants uniquement pour les faibles nombres de masse, jusque  $n = 7$ .

Les spectres de masse des esters méthyliques d'acides gras mono ou polysubstitués par des groupements méthyles ou autres, ont également été étudiés par RYHAGE et STENHAGEN (51, 53, 54). La présence du substituant méthyle produit dans la plupart des cas un effet prononcé sur le spectre de masse. L'ion moléculaire



se fragmente de préférence au niveau du carbone tertiaire, donnant naissance

aux ions



qui diffèrent de 28 unités de masse. Le pic de l'ion méthoxycarbone intermédiaire  $m/e = 59 + 14n + 14$ , qui diffère de 14 unités de masse des deux ions précédents, est très petit, sauf pour les esters du type antéiso, pour lesquels les pics à  $m/e = M - 57$  et  $m/e = M - 29$ , quoique importants, sont plus petits que le pic à  $m/e = M - 43$ . Les esters du type antéiso se distinguent également des esters normaux par un pic à  $m/e = M - 29$  plus intense que le pic à  $m/e = M - 31$ . Les esters du type iso donnent un spectre de masse très voisin du spectre de leurs isomères normaux, mais la présence d'un petit pic à  $m/e = M - 65$  indique la présence d'un groupement isopropyle.

## II - RESULTATS OBTENUS AVEC NOS PRODUITS.

### 1°) Identification des esters méthyliques d'acides gras contenus dans la cire.

Les différents spectres sont obtenus à 70 eV à l'aide d'un spectromètre de masse "LKB" ; celui-ci est précédé d'un chromatographe en phase gazeuse dans lequel les différents composés sont séparés sur une colonne de silicone OV - 1. Ces spectres sont reproduits en diagramme linéaire (fig. 13 à 23). Les pics inférieurs à 0,5 % du pic de base ne sont pas représentés. L'ion le plus abondant, dont le pic est pris égal à 100 % (pic de base), est dans tous les cas l'ion à  $m/e = 74$ .

Nous trouvons également les ions de la série  $m/e = 59 + 14n$ , en particulier à  $m/e = 87, 143, M - 43, M - 29$  et les ions à  $m/e = M, m/e = M - 31$ .

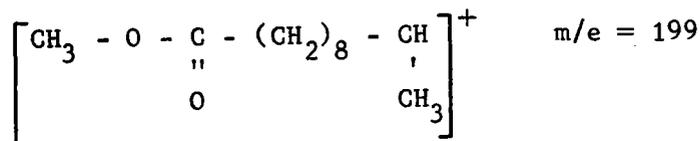
Nous ne pensons pas que la chaîne linéaire soit substituée par un groupement méthyle, ou autre, car cette substitution se traduirait par une anomalie dans l'allure générale du spectre, spécialement dans la série  $m/e = 59 + 14n$ . Rappelons d'autre part que les valeurs des abondances relatives peuvent différer entre deux spectres d'un même composé, mais l'allure générale du spectre ne dépend pas des conditions opératoires (52), sous réserve qu'il n'y ait pas de dégradation thermique importante de l'échantillon.

Nous avons comparé les spectres de masse des esters méthyliques de notre cire avec les spectres d'échantillons purs obtenus par RYHAGE et STENHAGEN (52), en nous limitant aux ions oxygénés, qui sont les plus caractéristiques de la fragmentation des esters méthyliques à longue chaîne (voir fig. 24 à 31). Dans aucun des cas, il n'apparaît d'anomalie dans la série  $m/e = 59 + 14n$ . Le pic à  $m/e = M - 31$  est plus grand que le pic à  $m/e = M - 29$ , sauf pour les termes en  $C_{25}$  (fig. 19 et 30),  $C_{27}$  (fig. 21),  $C_{29}$  (fig. 23). L'explication en est donnée ci-dessous.

L'absence de pic à  $m/e = M - 65$  nous permet d'écarter les structures du type iso. La seule exception concerne l'acide en  $C_{16}$ , pour lequel on trouve un petit pic à  $m/e = 270 - 65 = 205$  (fig. 13).

## 2°) Anomalies

a) Le spectre de la figure 13 (terme en  $C_{16}$ ) révèle la présence d'un pic important à  $m/e = 149$ . Ce pic correspond, dans le spectre de masse d'esters méthyliques substitués par un méthyle en position 10, à la perte de méthanol et d'eau (199-32-18) à partir de l'ion (53) :



L'intensité insuffisante du pic à  $m/e = 199$ , nous conduit à rejeter cette structure. En fait il s'agit probablement d'un artéfact provenant d'une contamination par du dioctylphtalate souvent utilisé dans les pompes à diffusion d'huile du système d'introduction (55). D'autre part, la présence d'un petit pic à  $m/e = 205$  ( $M - 65$ ) semble plaider en faveur d'une structure iso pour le terme en  $C_{16}$  ( $M = 270$ ).

b) Le spectre de masse du terme en  $C_{20}$  (fig. 15) contient un certain nombre de pics difficilement attribuables à un ester méthylique normal ou ramifié. La hauteur du pic à  $m/e = 99$  est anormale ainsi que la présence de petits pics à  $m/e = 114, 126, 184, 196, 295, 306, 324$ .

Ils indiquent la présence en faible proportion d'un composé non identifié, probablement insaturé (pic à  $m/e = 324$ ), élué en même temps que l'eicosanoate de méthyle (acide en  $C_{20}$ ,  $M = 326$ ).

c) Les spectres des esters des acides en  $C_{25}$ ,  $C_{27}$  et  $C_{29}$  (fig. 19, 21 et 23) contiennent, en plus des pics appartenant aux esters normaux, quelques pics supplémentaires, provenant de la fragmentation de composés élués avec ces esters. L'intensité accrue des pics à  $m/e = 84, 98, 112$  indique la présence d'esters diméthyliques de diacides normaux. Pour ceux-ci, le pic de base est  $m/e = 98$ . L'ion moléculaire est très peu abondant, mais on rencontre dans le domaine des nombres de masse élevés, des pics à  $m/e = M - 31, M - 64, M - 73, M - 92, M - 105$  et  $M - 106$  (56). Le tableau VIII donne les nombres de masse de ces différents ions pour les esters diméthyliques des acides docosanedioïque ( $C_{22}$ ), tétracosanedioïque ( $C_{24}$ ) et hexacosanedioïque ( $C_{26}$ ) ainsi que les pics effectivement observés.

	Pics théoriques (56)			Pics observés		
	C <sub>22</sub>	C <sub>24</sub>	C <sub>26</sub>	Fig. 19	Fig. 21	Fig. 23
M	398	426	454			
M- 31	367	395	423	367	395	423
M- 64	334	362	390	334	362	390
M- 73	325	353	381	325	353	381
M- 92	306	334	362		334	
M-105	293	321	349	293	321	349
M-106	292	320	348	292	320	348

TABLEAU VIII : Pics caractéristiques d'esters diméthyliques de diacides normaux et pics observés dans nos spectres.

Dans le spectre des esters méthyliques des acides en C<sub>25</sub>, C<sub>27</sub>, C<sub>29</sub> (fig. 19, 21 et 23), nous observons les pics caractéristiques des esters méthyliques des diacides en C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub> respectivement. Les pics les moins intenses, m/e = M et m/e = M - 92, ne sont pas visibles, puisqu'ils représentent dans le spectre de masse du docosanedioate de méthyle pur moins de 3 % et 6 % respectivement du pic à m/e = 98 (56). Leur faible intensité ou leur absence n'exclut donc pas la présence de diacides.

Les pics à m/e = M - 31 et m/e = M - 73 des diesters se superposent aux pics à m/e = M - 29 et m/e = M - 71 des monoesters qu'ils accompagnent, ce qui explique la hauteur inhabituelle des pics à m/e = 367, 395, 423 par rapport aux pics m/e = 365, 393, 421 respectivement, qui correspondent

à la perte d'un méthoxyle par l'ion moléculaire  $\left[ \text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOCH}_3 \right]^+$ .

d) La présence du pic moléculaire de l'acide en  $\text{C}_{24}$  à  $m/e=382$ , dans le spectre du terme en  $\text{C}_{25}$ , révèle une séparation chromatographique imparfaite des acides en  $\text{C}_{25}$  et  $\text{C}_{24}$ . On peut faire des constatations analogues en examinant les spectres des acides en  $\text{C}_{27}$  (présence de l'acide en  $\text{C}_{26}$ , pic à  $m/e = 410$ ) et  $\text{C}_{29}$  (présence de l'acide en  $\text{C}_{28}$ , pic à  $m/e = 438$ ).

D'autres petits pics traduisent également la présence d'un ou plusieurs autres composés. Quoi qu'il en soit, l'allure générale du spectre de masse d'un ester méthylique normal n'est que peu modifiée par la présence de ces composés, qui ne représentent par conséquent qu'une fraction mineure des esters totaux.

### III - SPECTROMETRIE DE MASSE PAR INTRODUCTION DIRECTE.

Les substances volatiles en CPV ne représentant que le quart environ de la cire, celle-ci a également été étudiée par introduction directe dans la source ionique du spectromètre de masse, la température du dispositif d'introduction étant programmée de  $50^\circ\text{C}$  à  $250^\circ\text{C}$ . Des spectres de masse ont été enregistrés à différentes températures. Ils correspondent à la volatilisation progressive des esters méthyliques des acides gras décrits précédemment. Sur le spectre de la figure 32 obtenu à  $90^\circ\text{C}$ , on note la présence des ions caractéristiques :  $m/e = 74, 87, 143$ , ainsi que des ions moléculaires :  $M = 326 (\text{C}_{20}), 340 (\text{C}_{21}), 354 (\text{C}_{22}), 368 (\text{C}_{23}), 382 (\text{C}_{24}), 396 (\text{C}_{25}), 410 (\text{C}_{26}), 424 (\text{C}_{27}), 438 (\text{C}_{28})$ . A  $120^\circ\text{C}$  apparaissent les ions moléculaires  $M = 452 (\text{C}_{29}), 466 (\text{C}_{30}), 480 (\text{C}_{31}), 494 (\text{C}_{32}), 508 (\text{C}_{33})$  et  $522 (\text{C}_{34})$ . Vers  $185^\circ\text{C}$  la volatilisation des esters méthyliques

d'acides gras est pratiquement terminée.

A partir de cette température, la complexité des spectres s'accroît et il n'est guère possible de mettre en évidence des caractéristiques précises, d'autant plus qu'il peut y avoir des dégradations thermiques plus ou moins importantes. Signalons qu'il apparaît deux séries d'ions pour des m/e très élevées entre 185°C et 250°C :

$$664 + 14n \text{ avec } 0 < n < 14$$

$$\text{et } 632 + 14m \text{ avec } 0 < m < 12$$

La figure (33) montre le spectre obtenu à 220°C.

Il ne nous a malheureusement pas été possible de faire les mesures de masse exacte de ces ions et donc de déterminer leur formule brute. En effet, les substances correspondantes sont présentes en faible quantité et se volatilisent pendant un temps trop court pour que la mesure exacte de la masse soit possible.

Le courant ionique total collecté passe vers 90°C par un maximum qui correspond à la volatilisation de la plus grande partie des esters méthyliques d'acides gras, puis il décroît lorsque la température du dispositif d'introduction augmente (fig. 34). Ceci montre qu'en dehors des esters méthyliques des acides gras, une quantité relativement faible d'autres composés est détectable par le spectromètre de masse dans les conditions utilisées. D'ailleurs l'analyse thermogravimétrique sous vide des cires méthylées montre que seulement 30 % de l'échantillon sont susceptibles de se volatiliser à 220°C.

#### IV - CONCLUSIONS

La technique de couplage entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse nous a permis de confirmer la structure linéaire des acides gras contenus dans la cire, à l'exception de l'acide en  $C_{16}$  qui a peut-être une structure iso. L'examen attentif des spectres nous a permis de détecter d'autres substances, contenues en faible proportion dans la cire, en particulier des diacides gras normaux. L'étude des cires par introduction directe dans le spectromètre de masse, montre que relativement peu d'autres substances sont identifiables par cette méthode.

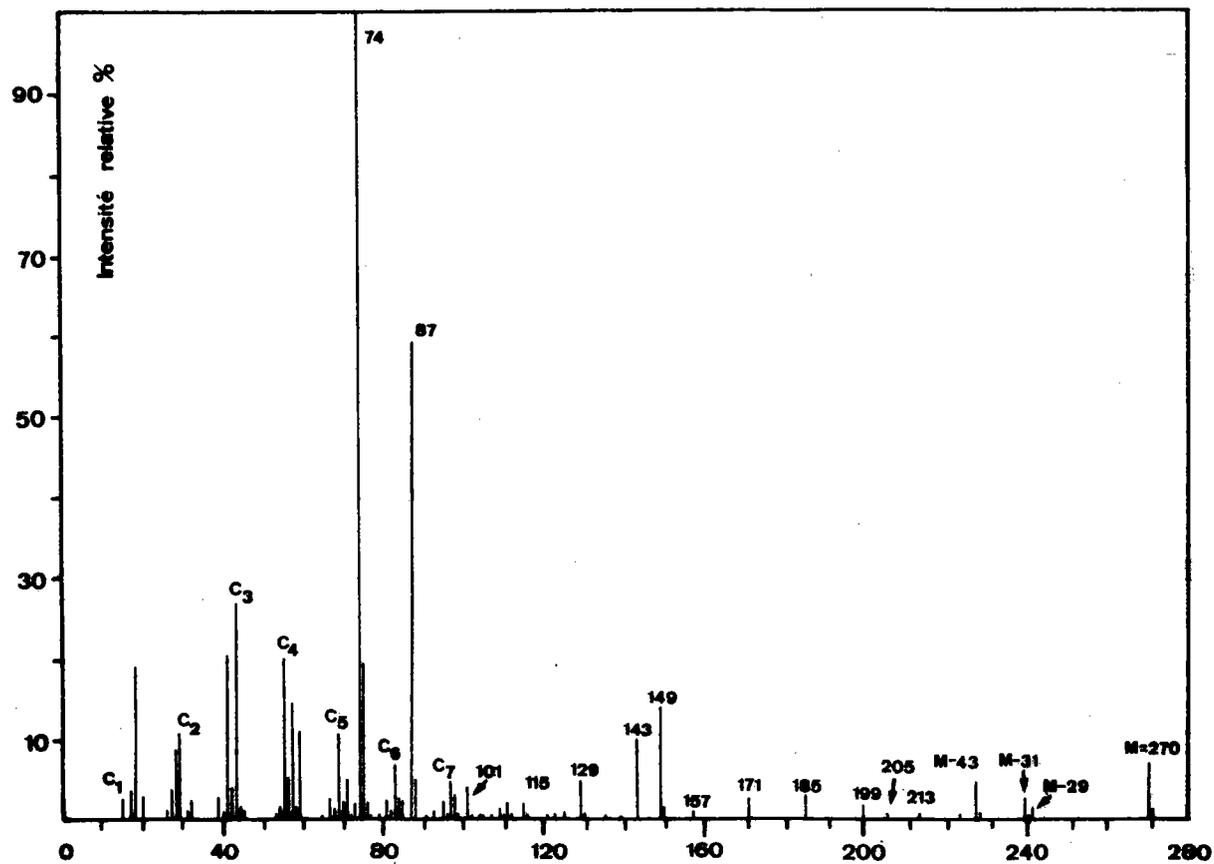


Fig. 13: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>16</sub> (M = 270).

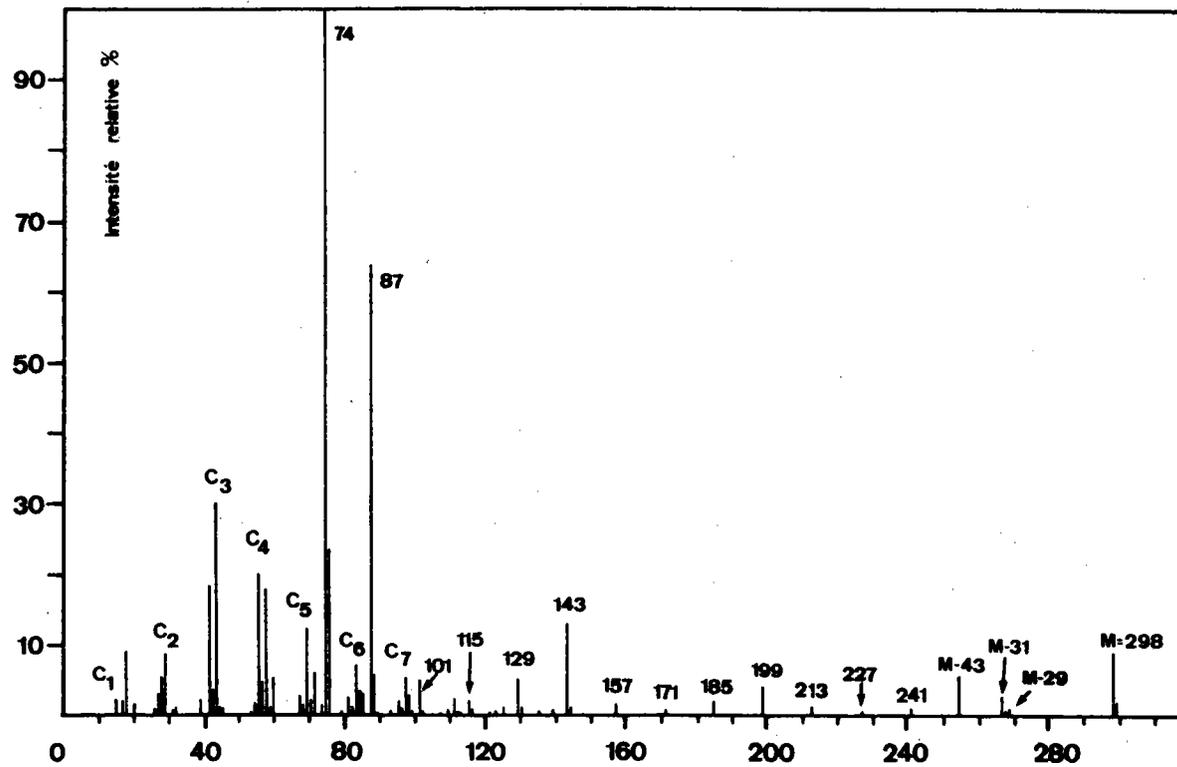


Fig. 14: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>18</sub> (M = 298).

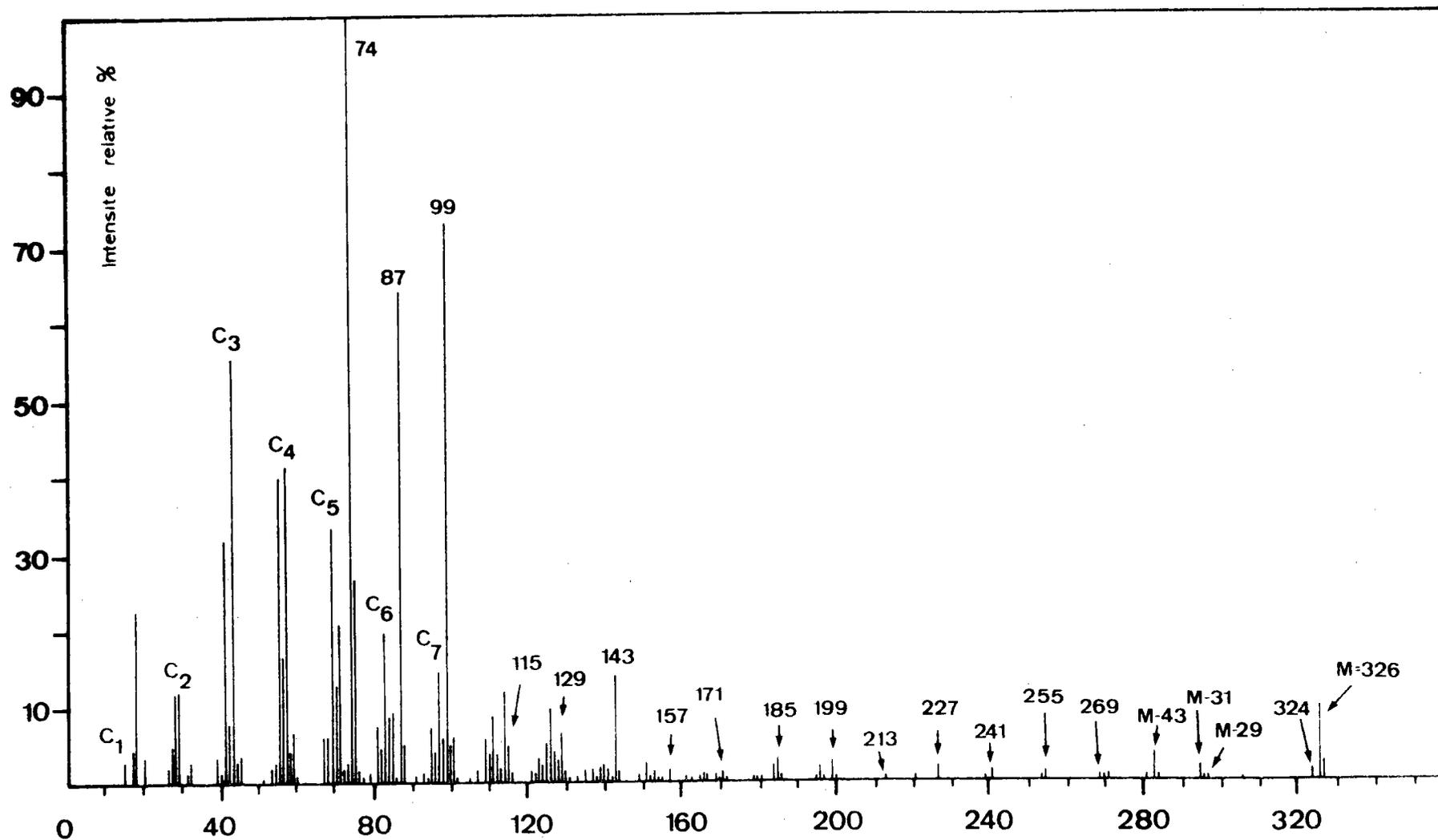


Fig. 15: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>20</sub> (M = 326).

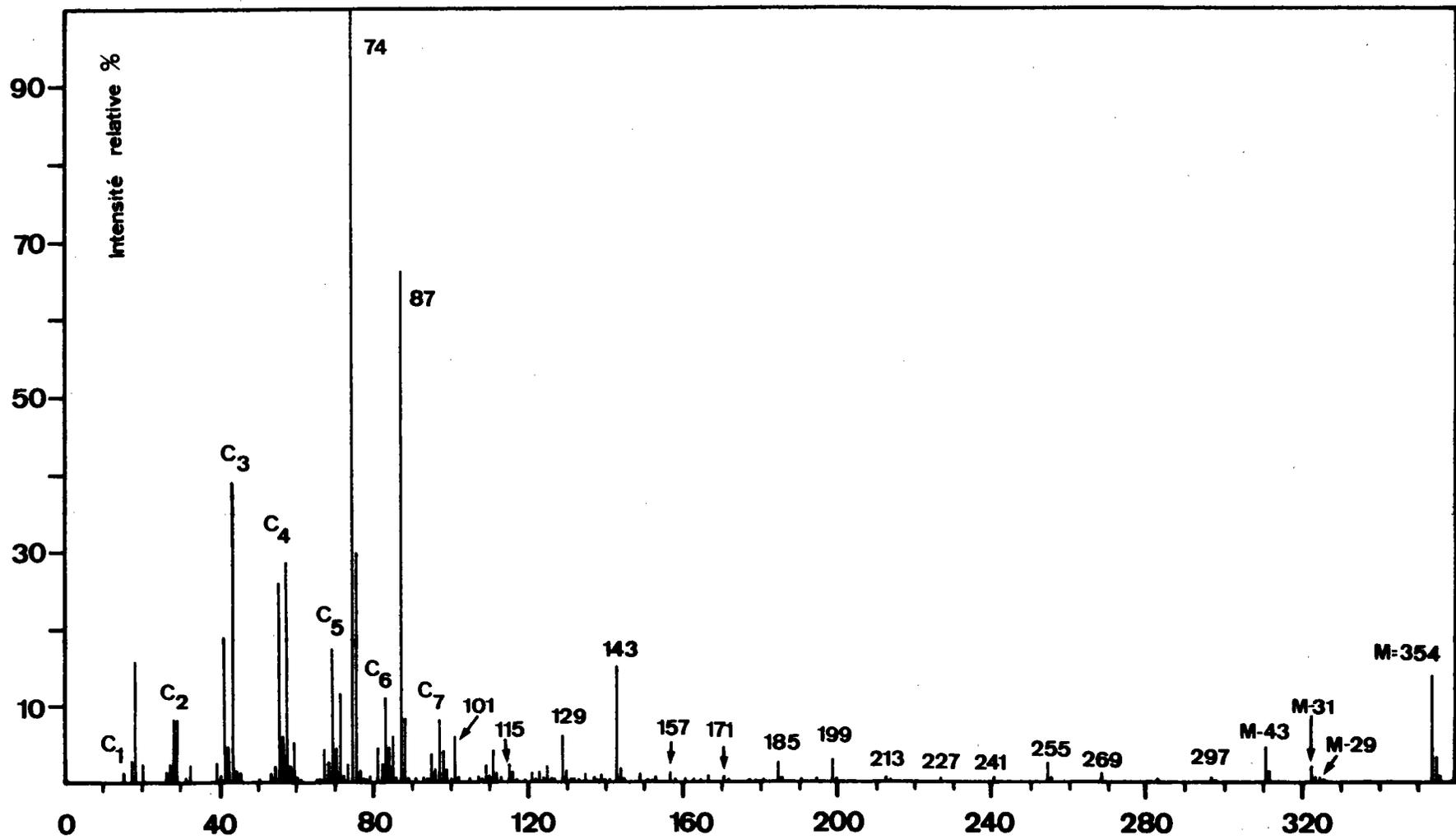


Fig. 16: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>22</sub> (M = 354).

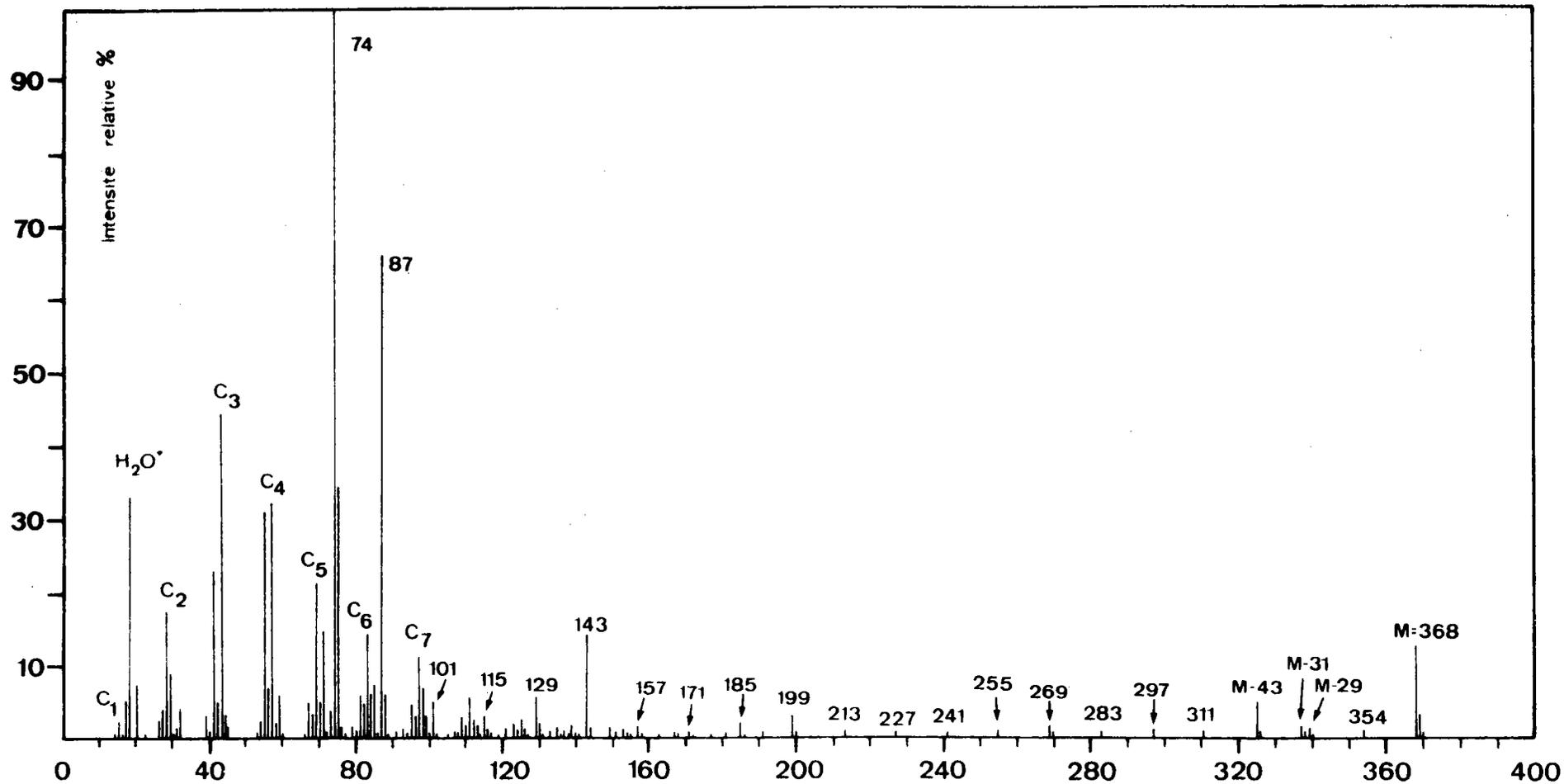


Fig. 17: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>23</sub> (M = 368).

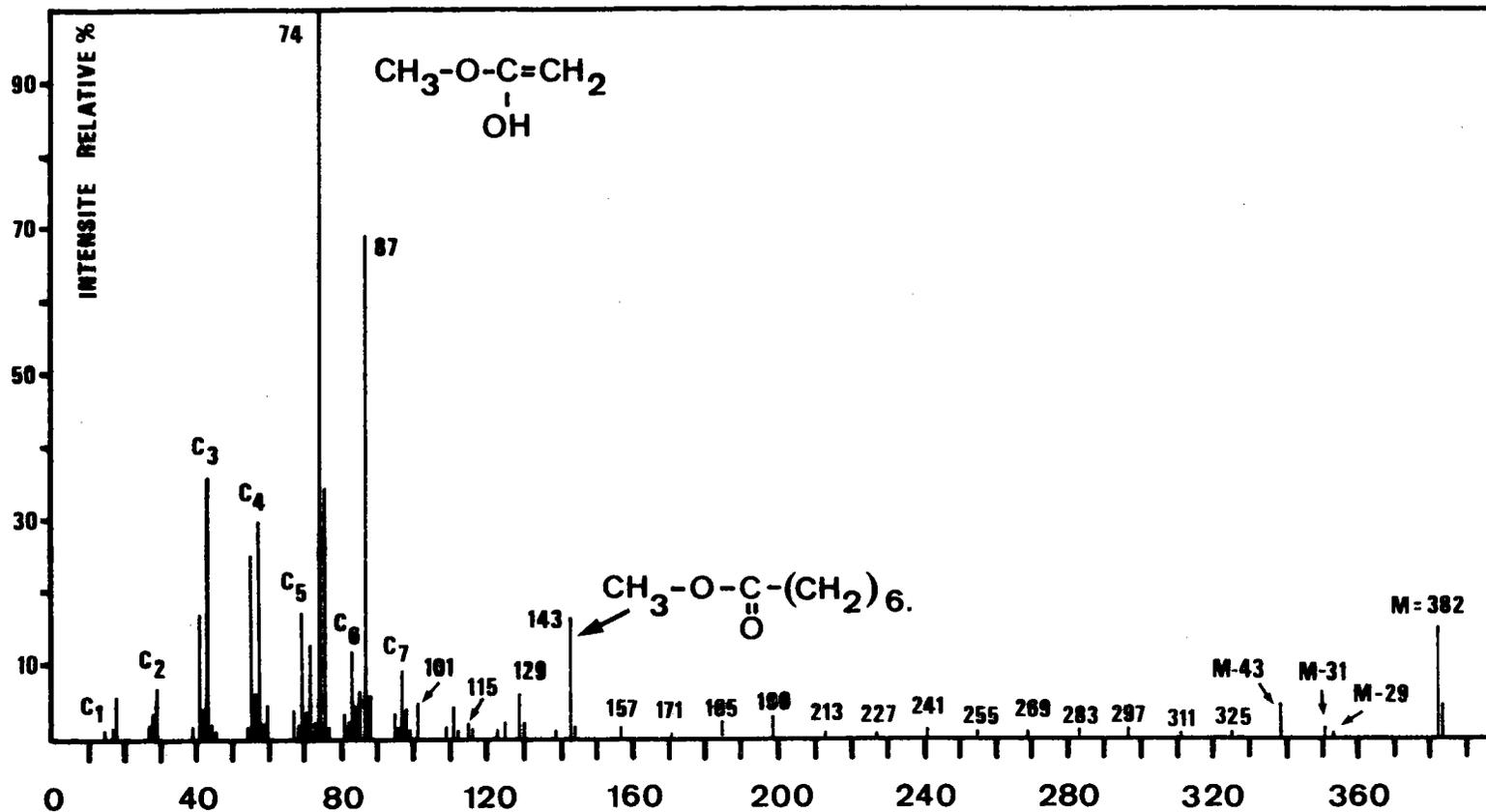


Fig. 18: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>24</sub> (M = 382).

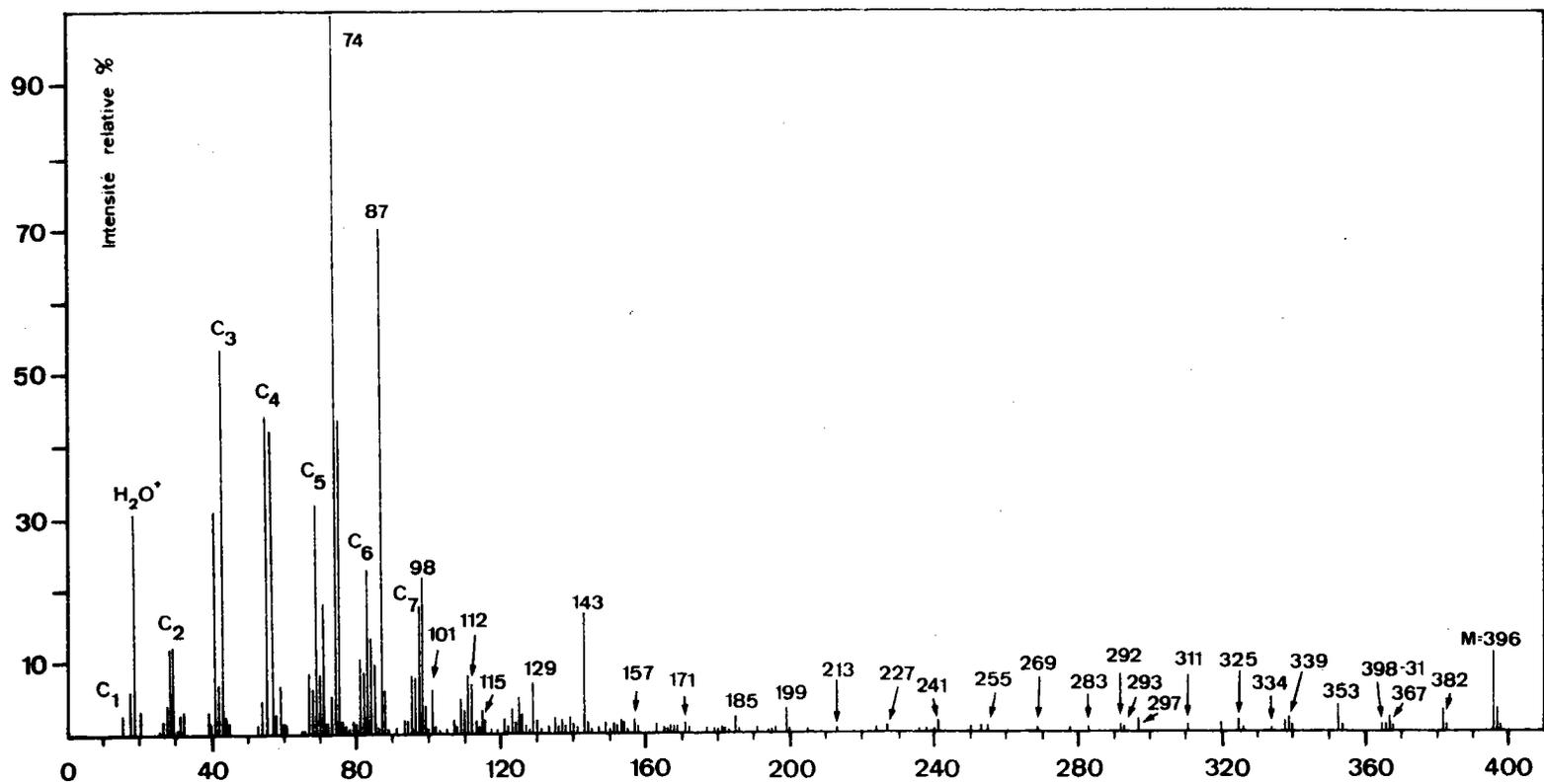


Fig. 19: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>25</sub> (M = 396).

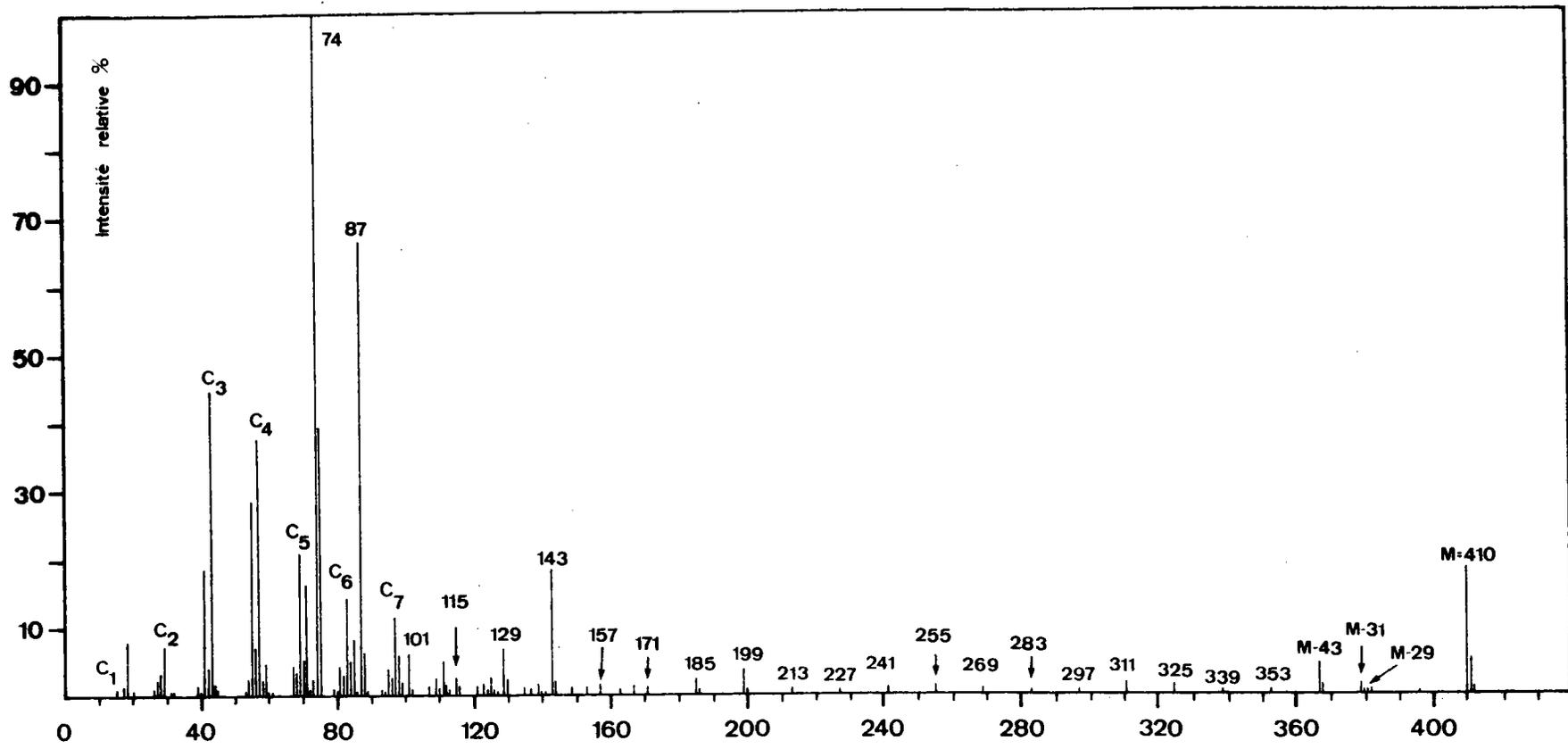


Fig. 20: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>26</sub> (M = 410).

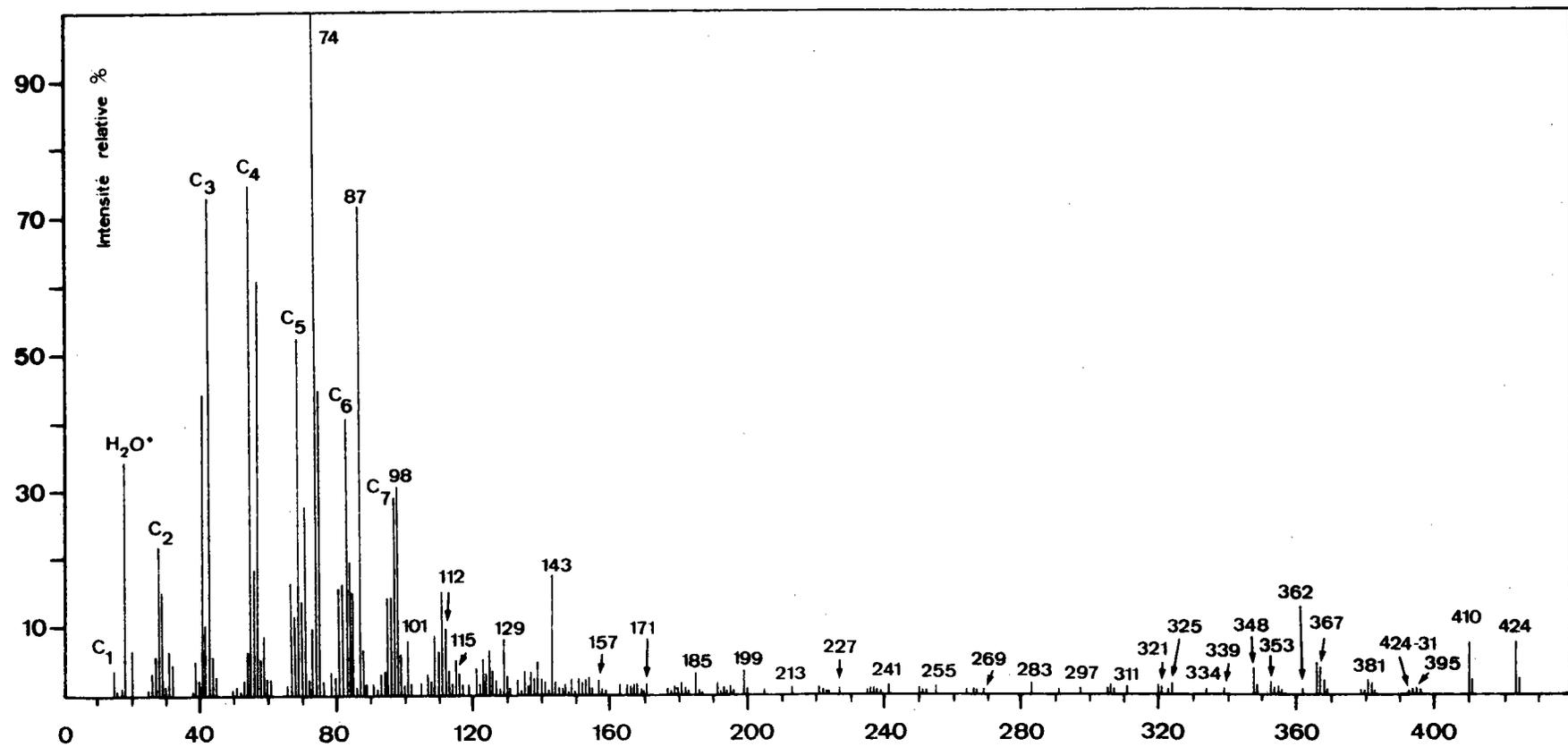


Fig. 21: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>27</sub> (M = 424).

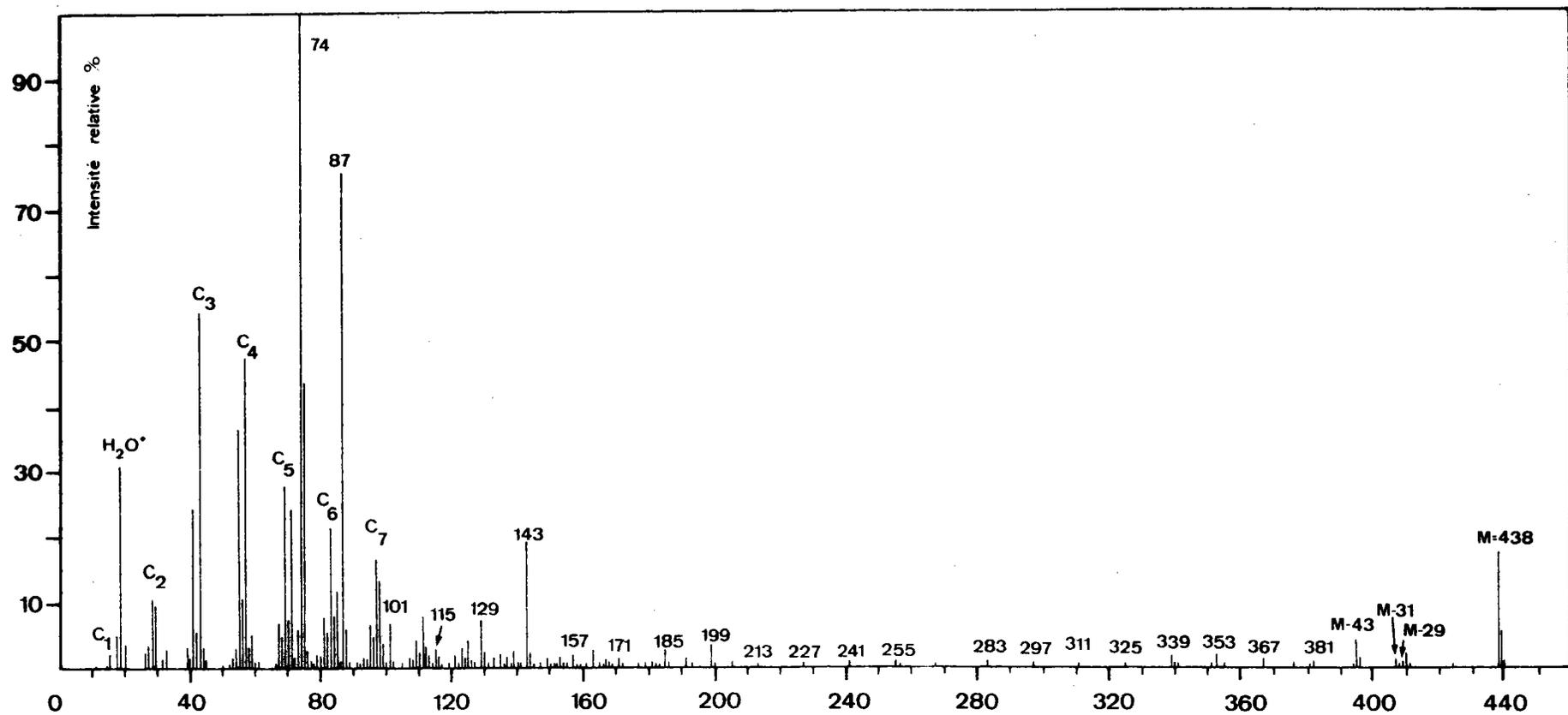


Fig. 22: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>28</sub> (M=438).

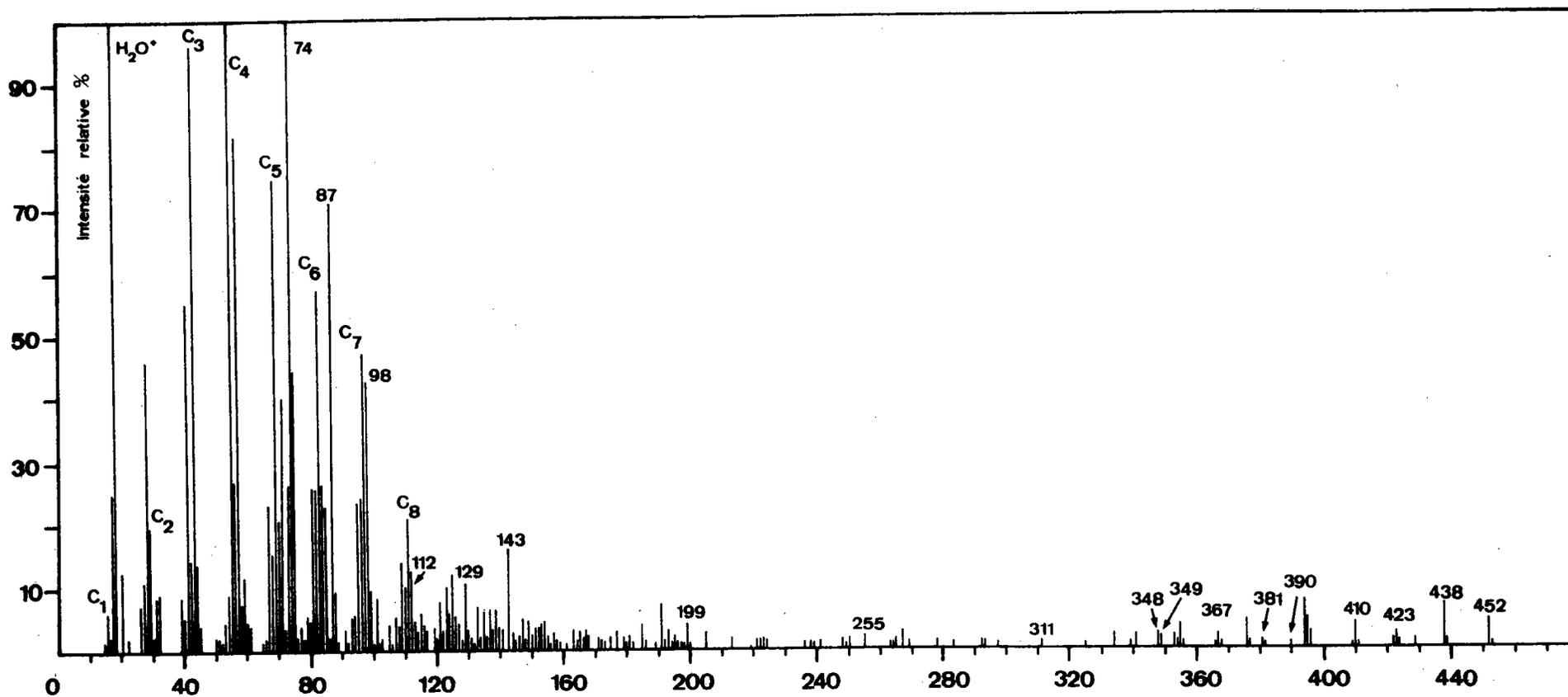


Fig. 23: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la cire par couplage CPV-SM: terme en C<sub>29</sub> (M = 452).

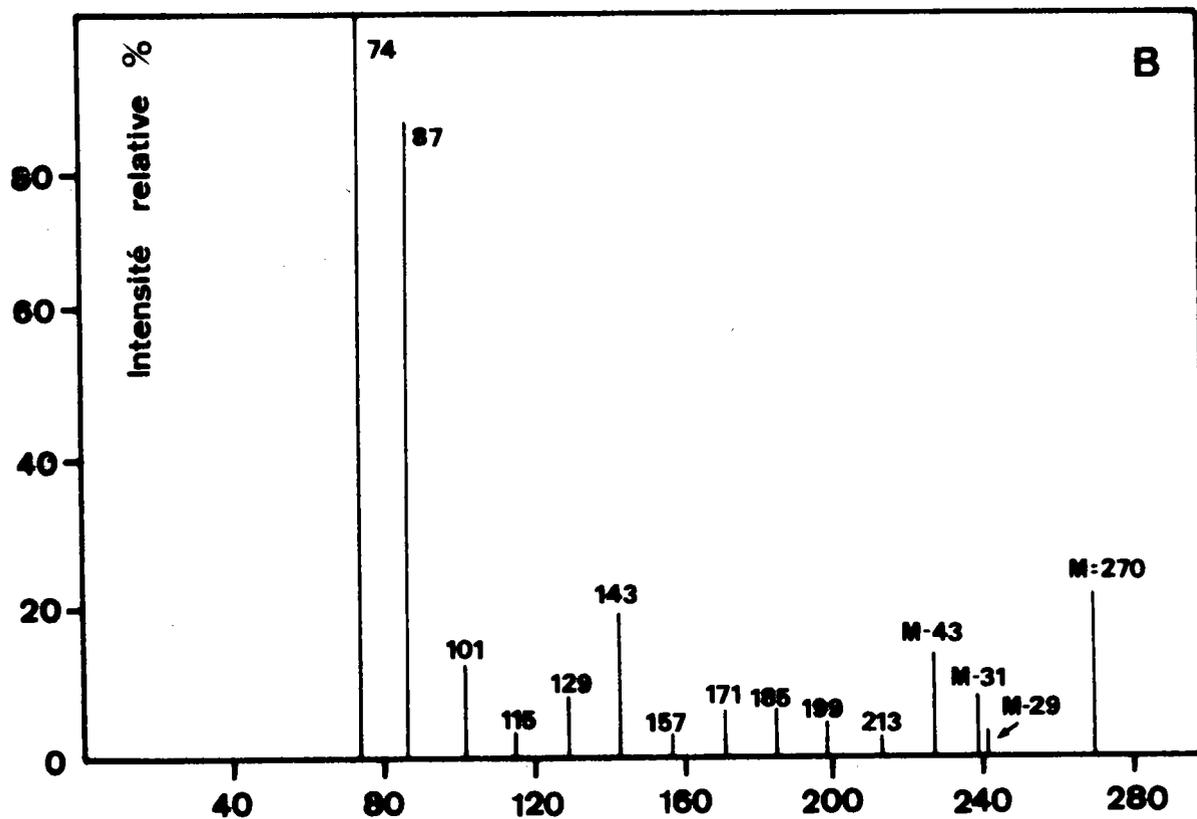
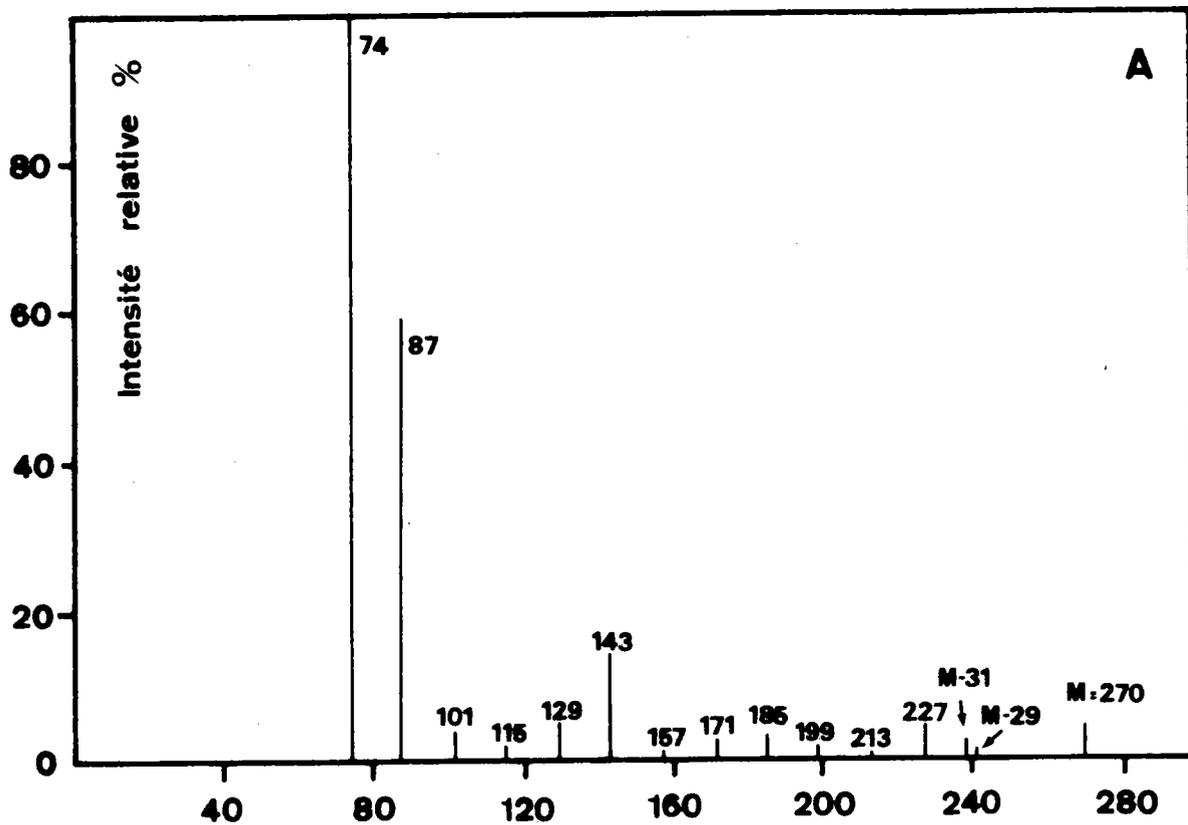


Fig. 24: Hexadécanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

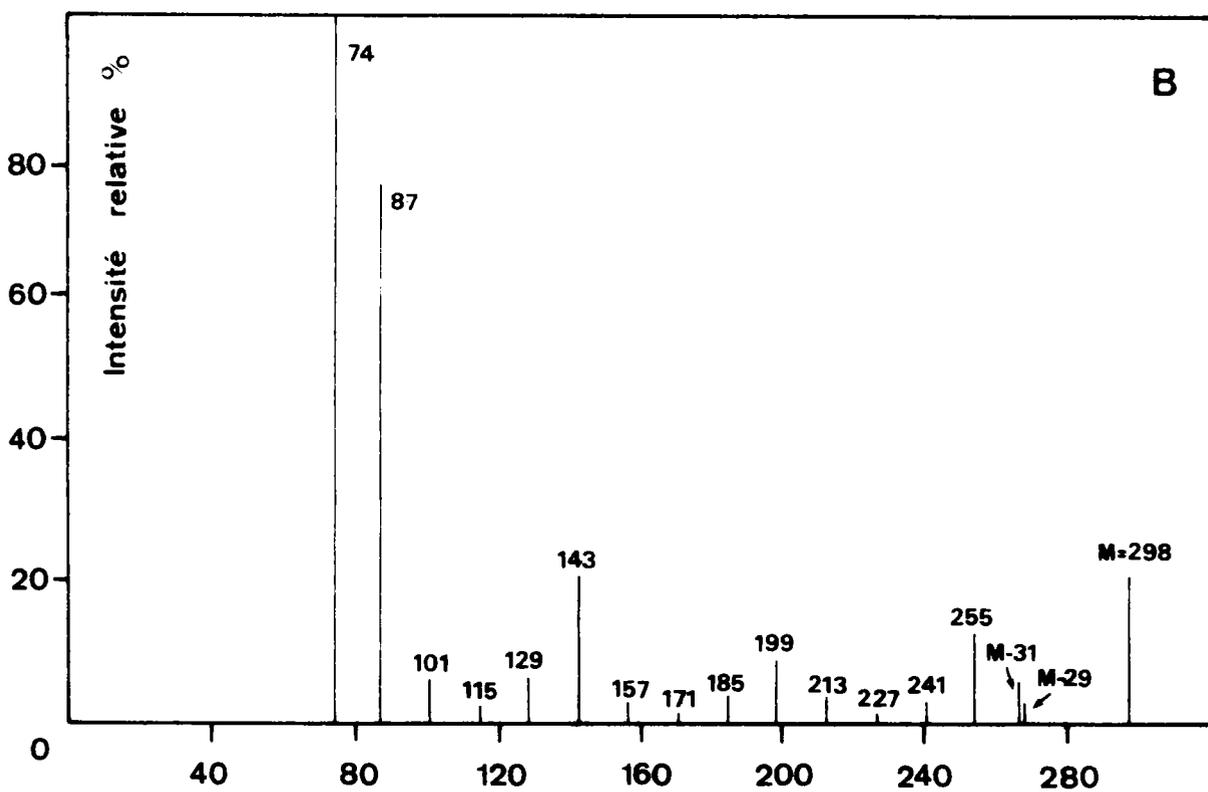
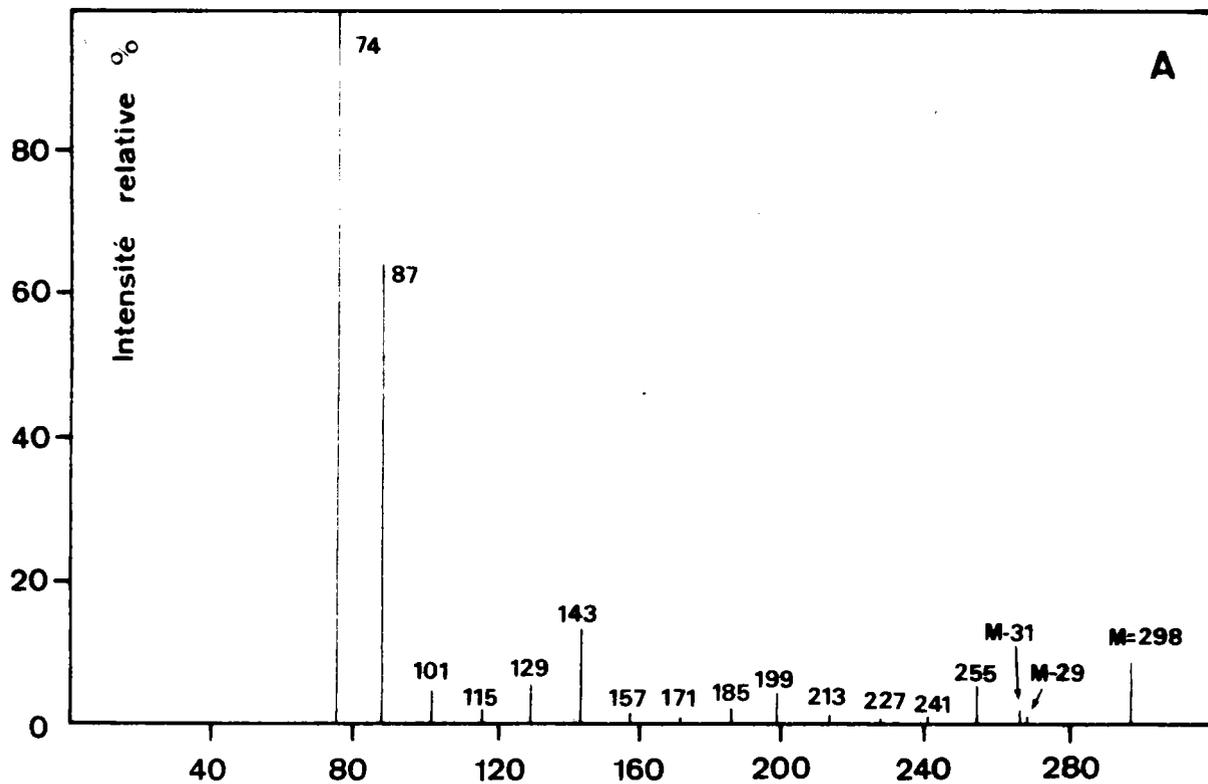


Fig. 25: Octadécanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

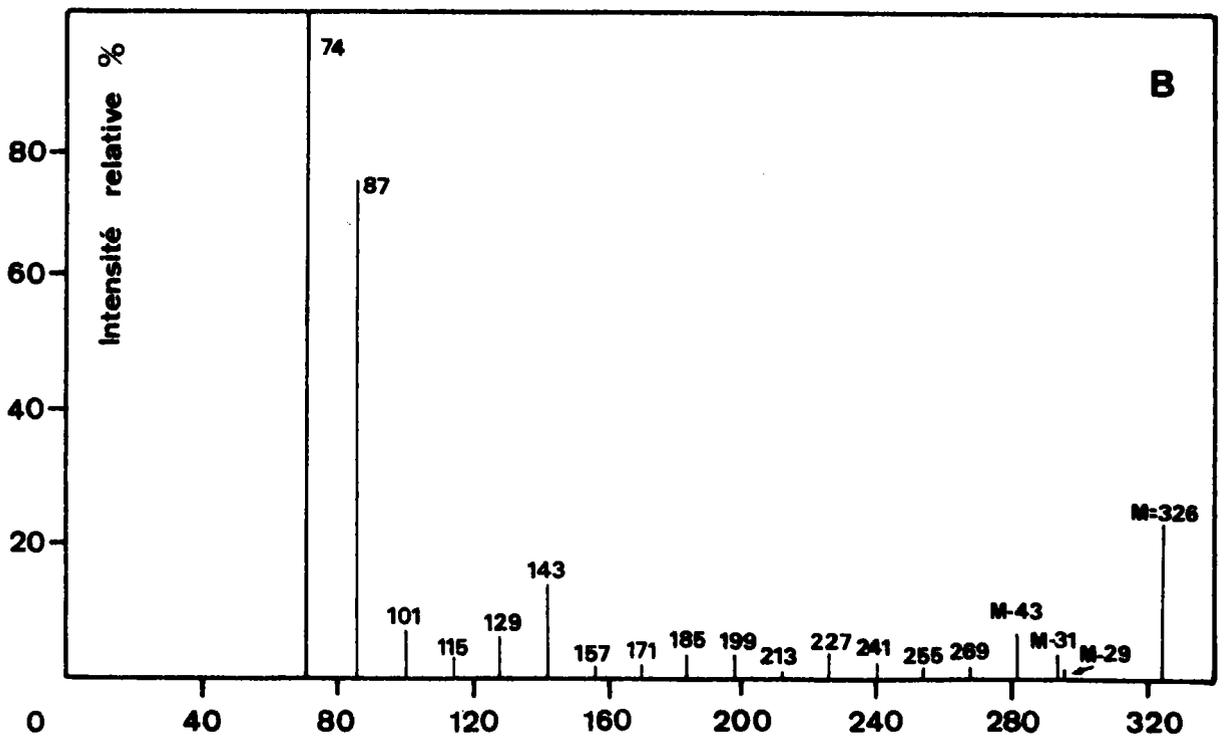
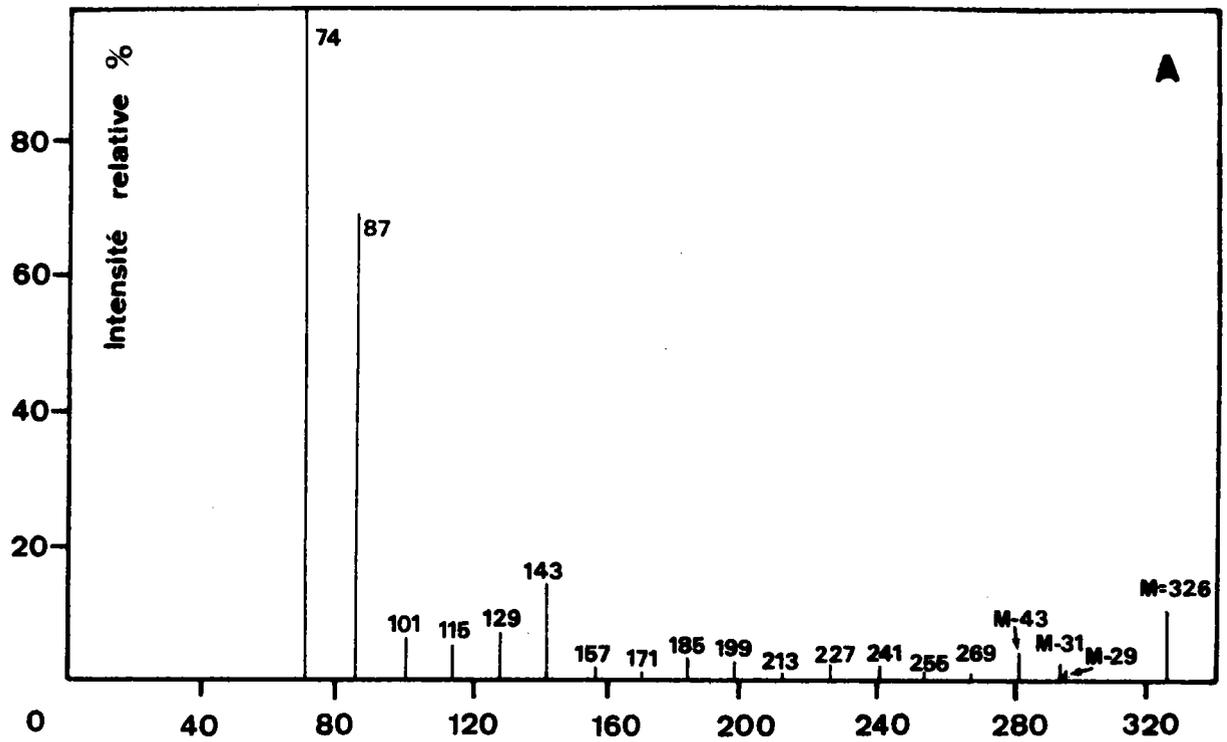


Fig. 26: Eicosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

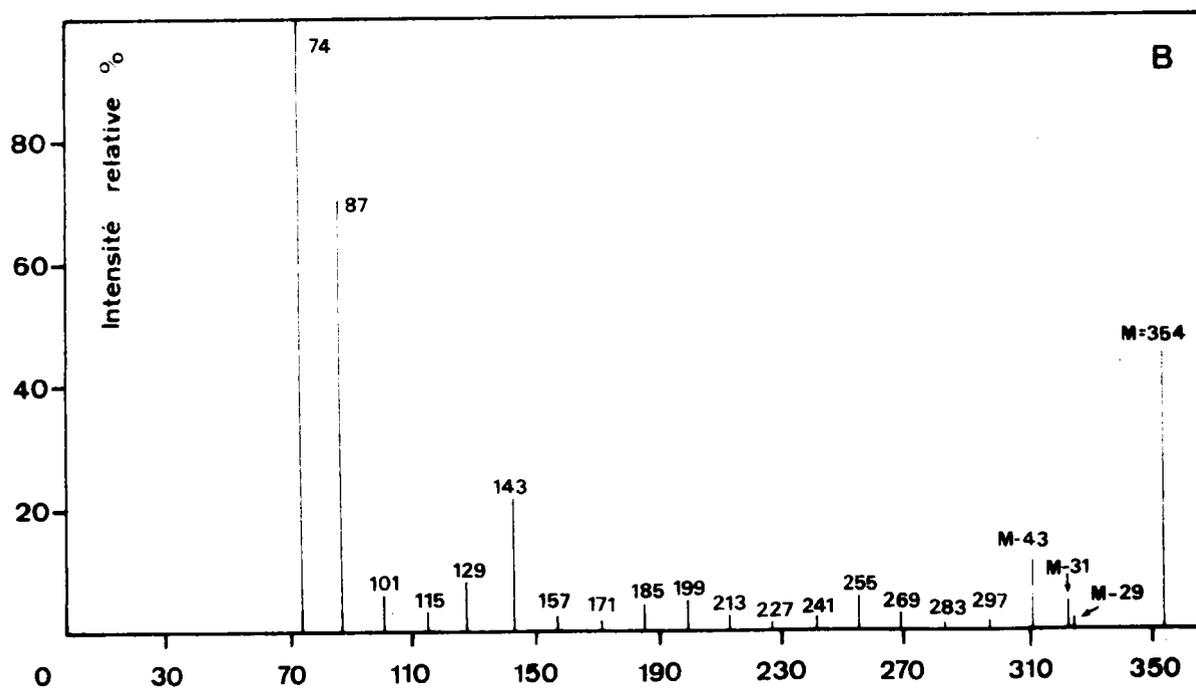
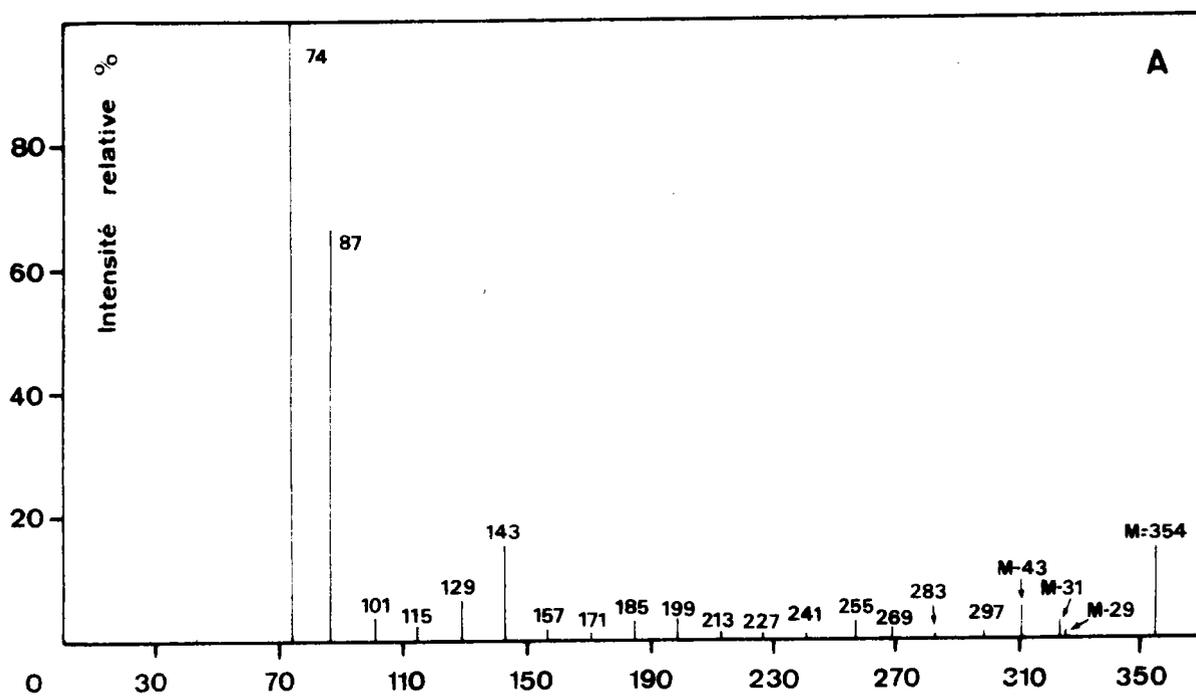


Fig. 27: Docosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

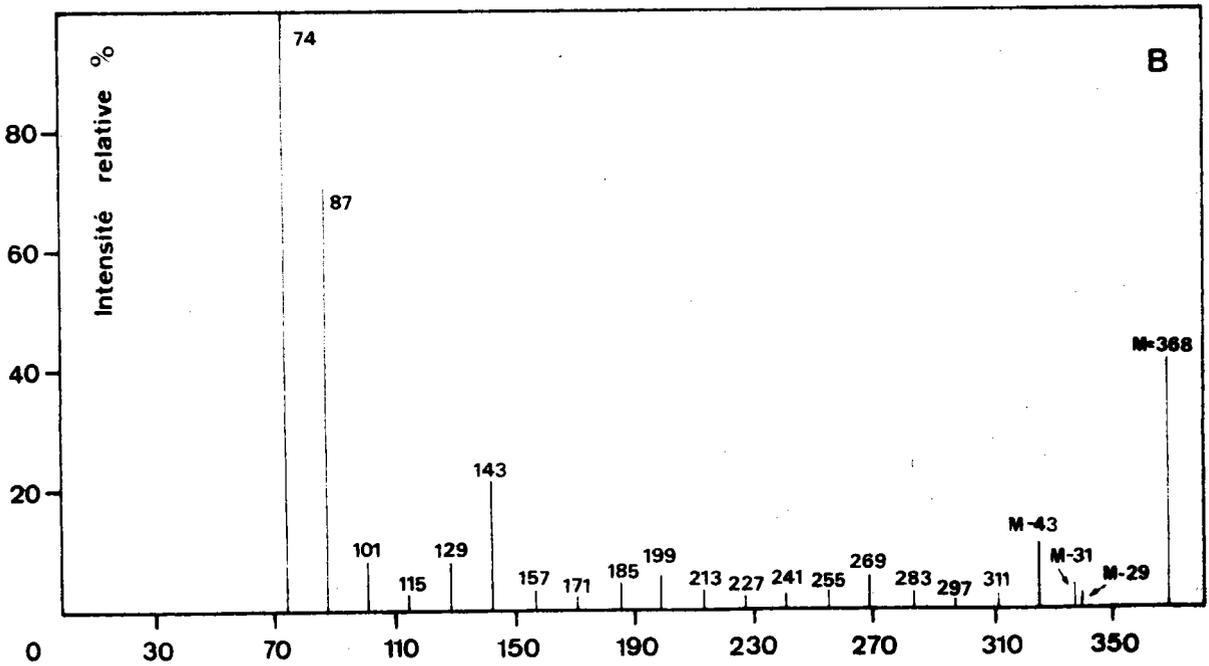
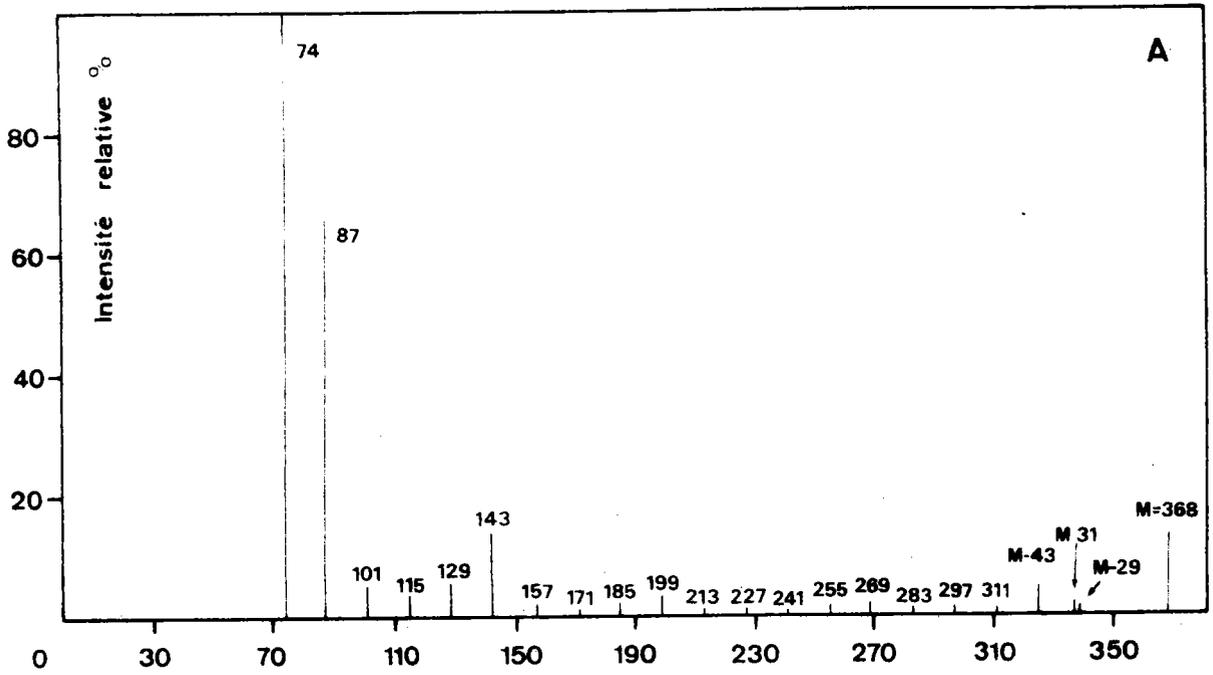


Fig. 28: Tricosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

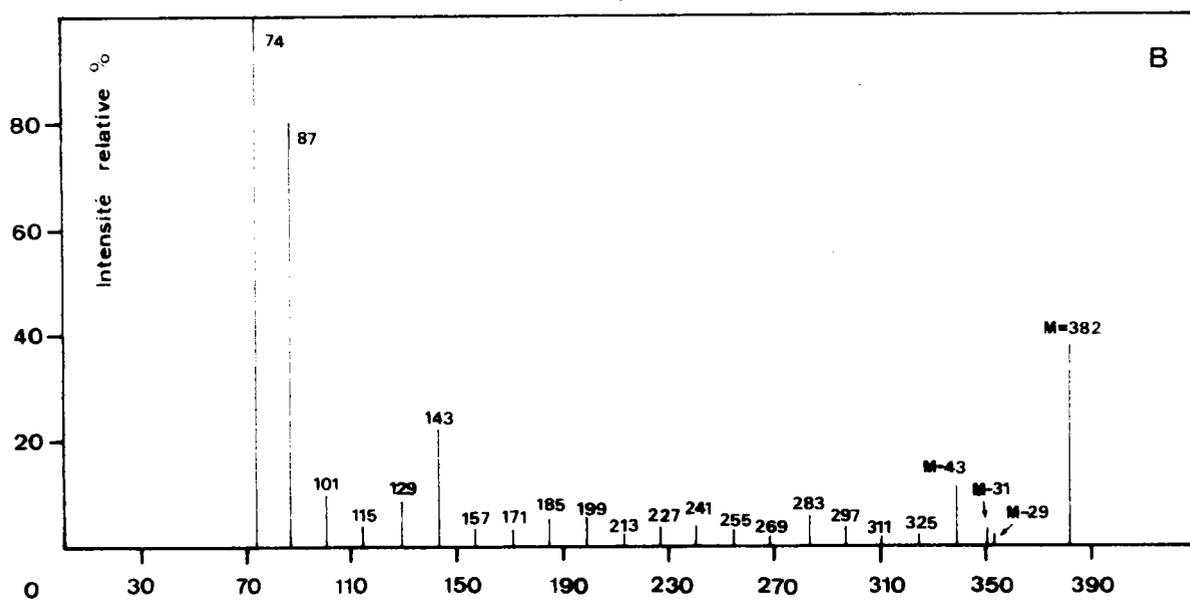
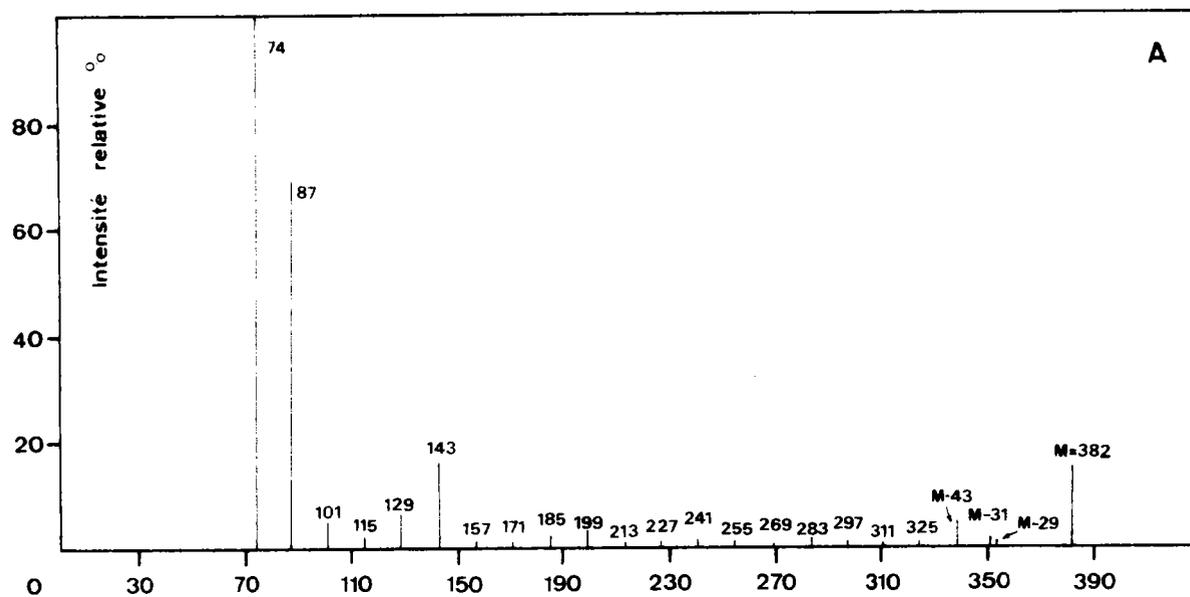


Fig. 29: Tétracosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

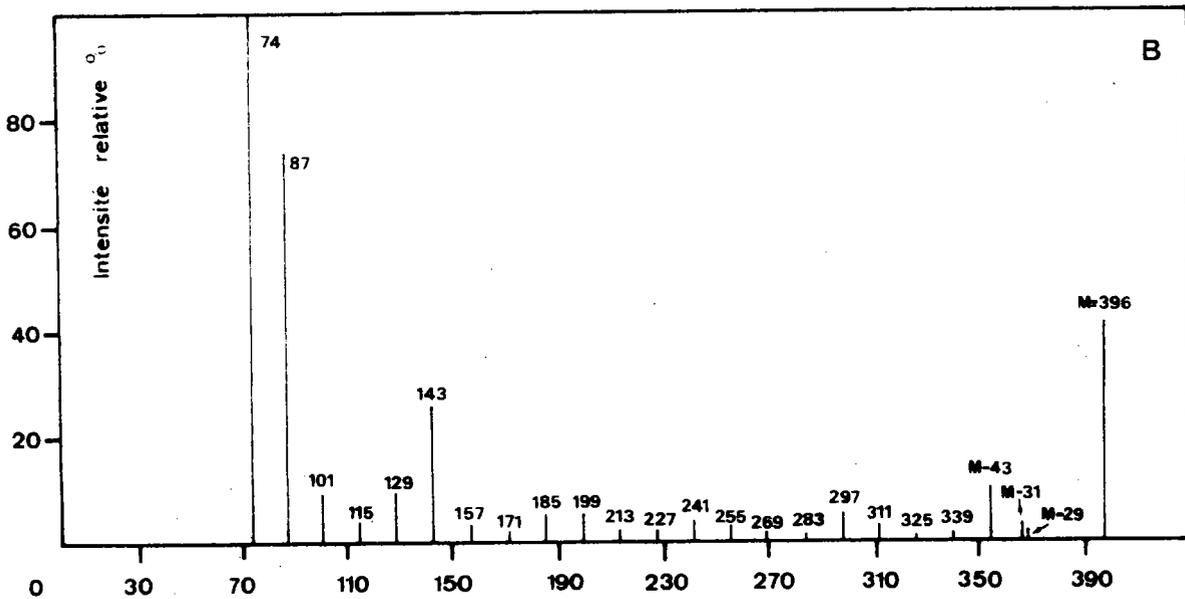
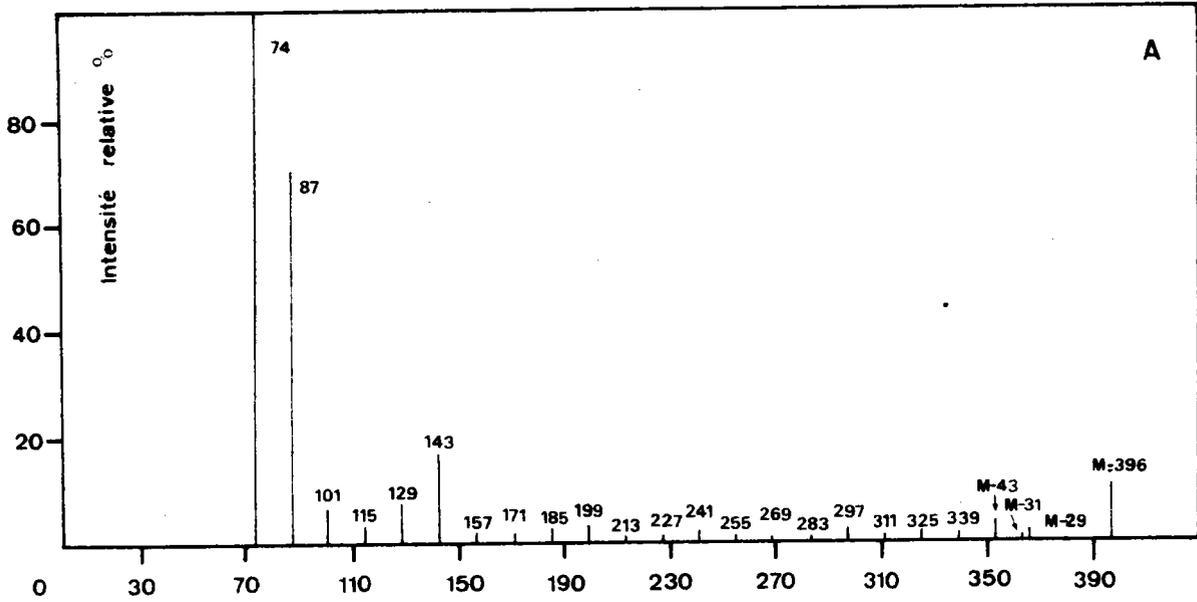


Fig. 30: Pentacosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

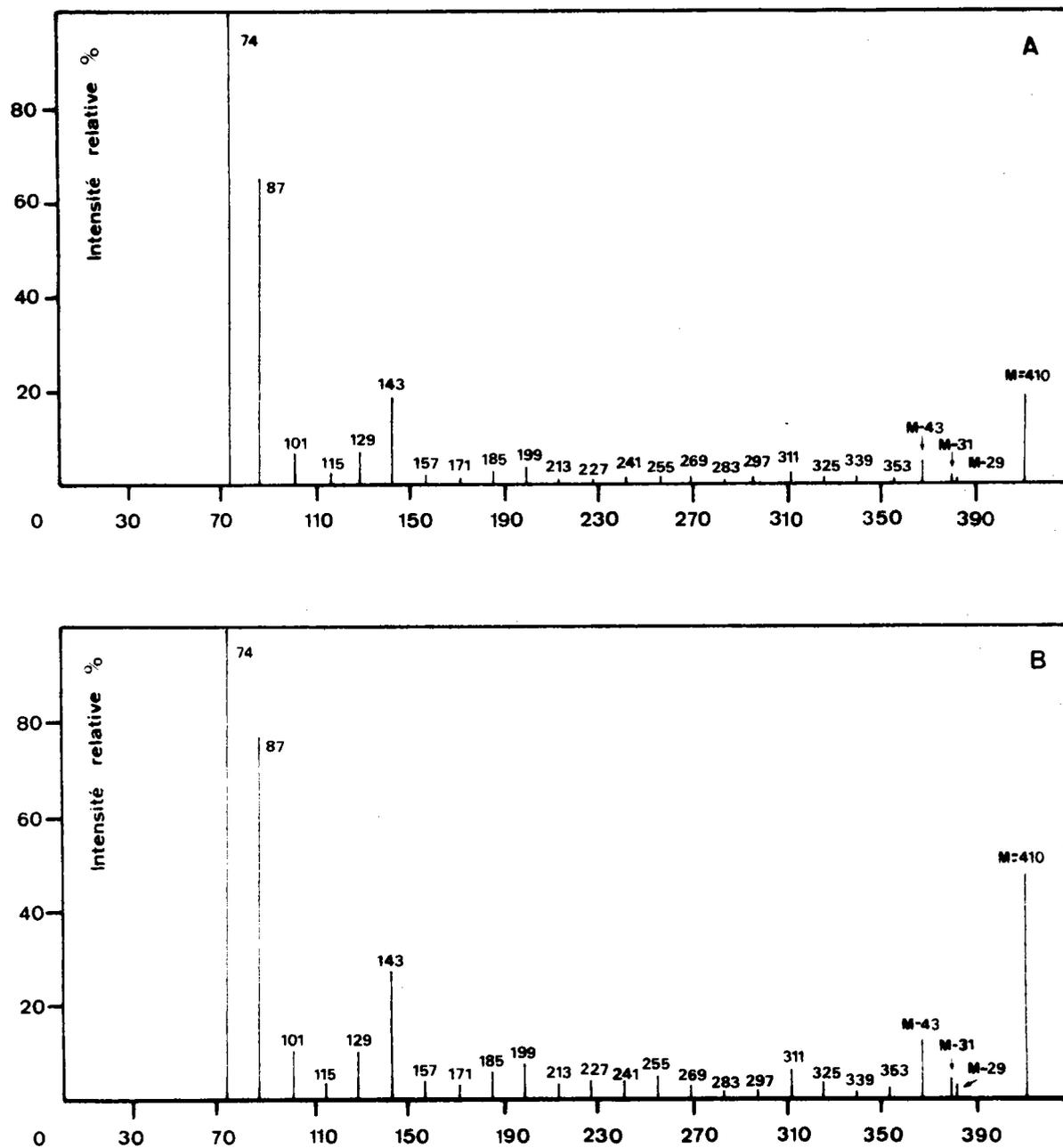


Fig. 31: Hexacosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé des cires; B: d'après (52).

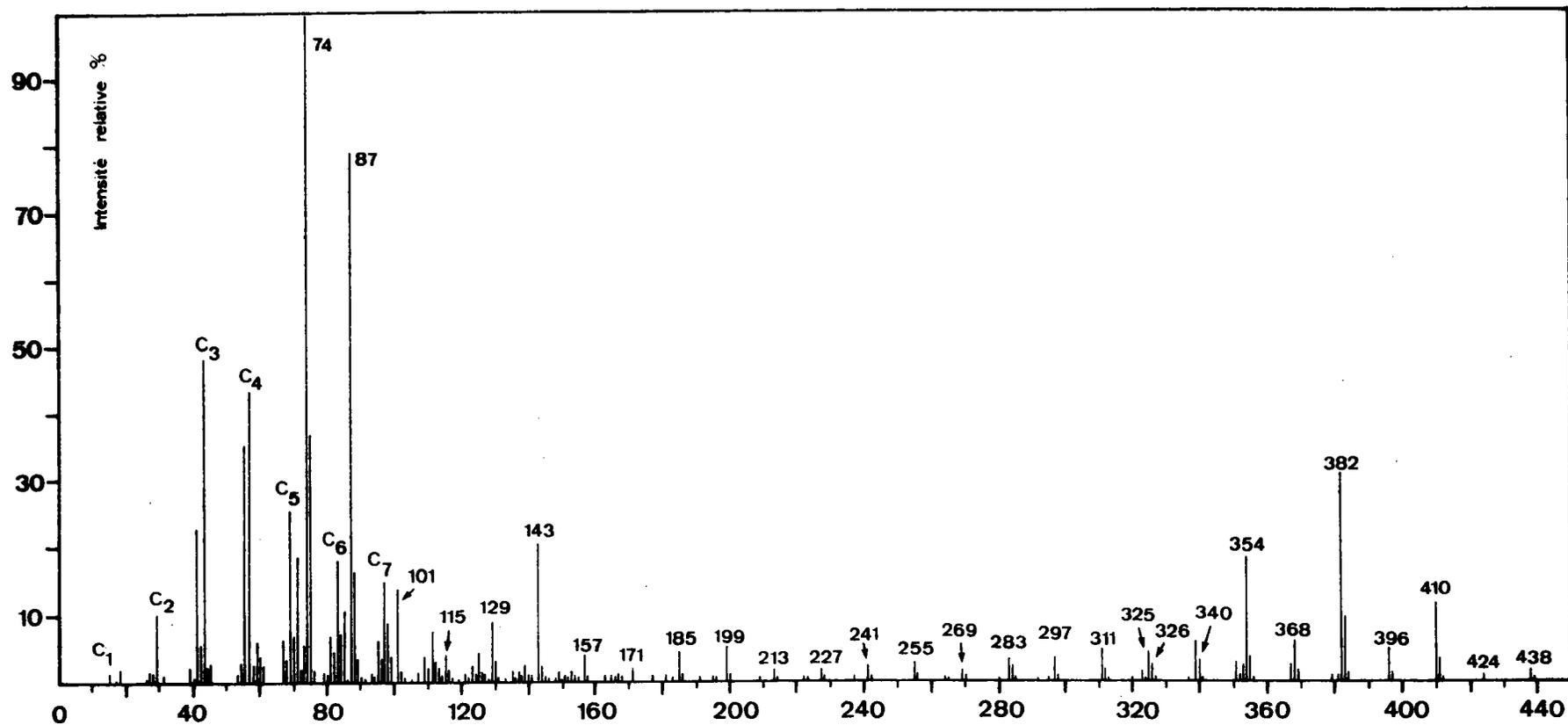


Fig. 32: Spectre de masse de la cire méthylée obtenu par introduction directe à 90°C.

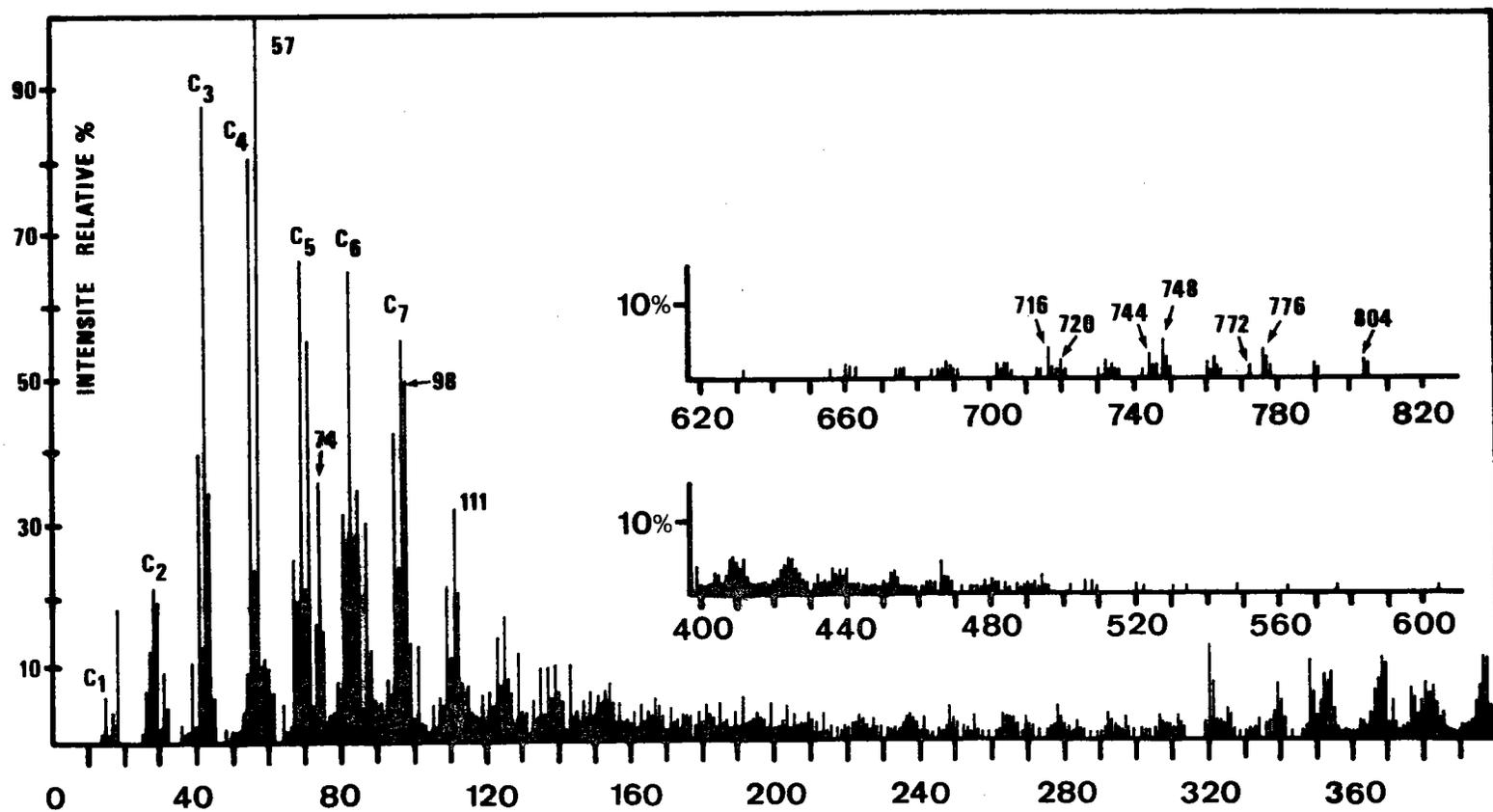


Fig. 33: Spectre de masse de la cire méthylée obtenu par introduction directe à 220°C.

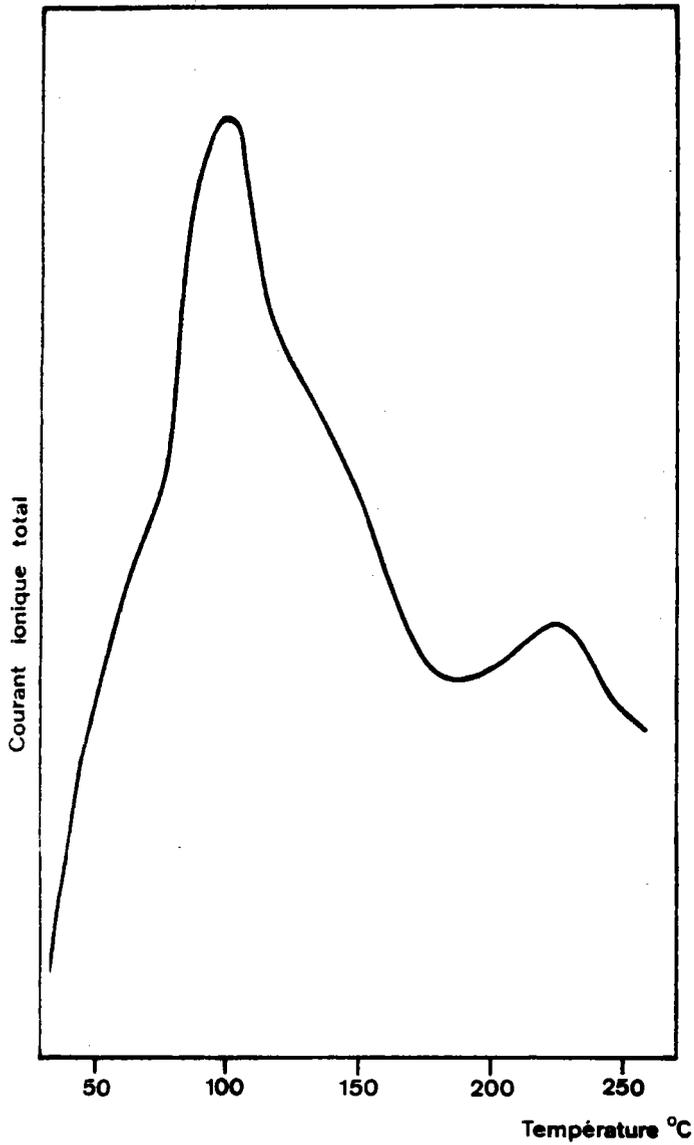


Fig. 34: Spectrométrie de masse de la cire méthylée par introduction directe: courant ionique total collecté en fonction de la température du dispositif d'introduction.

## CHAPITRE V

## ETUDE DES PRODUITS DE DEGRADATION DE LA CIRE

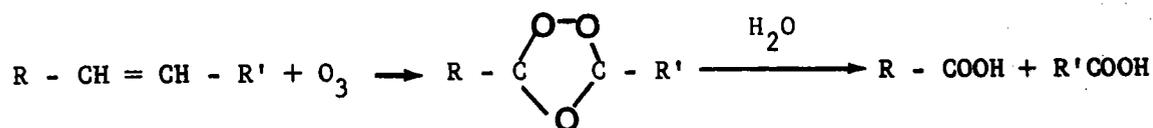
Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique et la spectrométrie de masse n'ayant pu permettre de caractériser plus de 25 % de la "cire acide", nous avons soumis celle-ci à diverses réactions de dégradation, dans l'espoir de réduire la longueur de chaîne ou la polarité des différents composés, et ainsi de permettre éventuellement leur élution en CPV.

I - DEGRADATIONS OXYDATIVES

L'indice d'iode et le spectre IR de la cire (fig. 3) indiquent la présence de composés insaturés. Nous avons cherché à attaquer ces composés au niveau d'éventuelles doubles liaisons éthyléniques.

1°) Ozonolyse

L'action de l'ozone sur les composés éthyléniques, suivie d'une hydrolyse de l'ozonide en présence de  $H_2O_2$ , peut se résumer par :



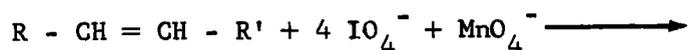
La coupure au niveau de la double liaison donne ainsi naissance à deux acides carboxyliques.

L'ozonisation d'une double liaison est effectuée dans des conditions optimales, lorsqu'on opère à basse température ( $- 65^{\circ}\text{C}$ ), avec une solution d'ozone dans le n-pentane (57). Nous avons essayé de nous rapprocher de ces conditions, malgré la faible solubilité de notre cire dans le n-pentane. Nous préparons une solution d'ozone en faisant barboter de l'oxygène ozonisé dans du n-pentane refroidi à  $- 40^{\circ}$  à l'aide d'un bain de chlorodifluorométhane. D'autre part une solution d'environ 100 mg de cire acide dans le minimum de chloroforme est également refroidie à  $- 40^{\circ}$ , puis versée dans la solution d'ozone. Le contact est maintenu pendant quelques minutes. Du fait de la précipitation d'une partie de la cire, il est nécessaire, après évaporation du solvant sous pression réduite, de recommencer une ou deux fois l'opération avant d'obtenir une décoloration quasi complète de la cire. Lorsque la décoloration est effective, les ozonides formés sont détruits en les traitant par de l'eau bouillante en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

L'analyse de la cire ainsi traitée montre que l'indice d'iode, initialement voisin de 41, tombe à 8 après ozonolyse. Ceci indique que les sites d'insaturation ont bien été attaqués par l'ozone. Mais l'analyse par CPV, après méthylation des produits de l'ozonolyse, ne révèle aucun changement dans les chromatogrammes, aussi bien qualitatif que quantitatif : aucun acide nouveau n'est donc apparu par action de l'ozone.

## 2°) Action d'un periodate en présence de $\text{KMnO}_4$

L'action d'un periodate sur une double liaison en présence de  $\text{KMnO}_4$  servant de catalyseur, donne naissance à deux acides carboxyliques suivant la réaction globale :

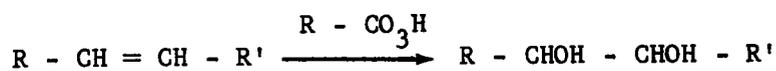


Le permanganate réagissant sur la double liaison est régénéré par l'action des ions  $IO_4^-$  et joue donc un rôle catalytique.

Le mode opératoire utilisé est voisin de celui préconisé par VON RUDLOFF (58). Une solution de 500 mg de cire dans 100 ml de pyridine, est agitée pendant 6 heures avec 12,5 ml de  $K_2CO_3$  à 2,5 g/l, 100 ml d'eau et 50 ml de réactif oxydant contenant 20 g de métaperiodate de sodium et 2,5 millimoles de  $KMnO_4$  par litre. En fin de réaction, l'iode est réduit par un excès de métabisulfite de sodium. Après acidification, les produits de l'oxydation sont extraits à l'éther. La décoloration obtenue n'est que partielle et l'analyse par CPV des dérivés méthylés ne fournit, comme après ozonolyse, aucun renseignement supplémentaire.

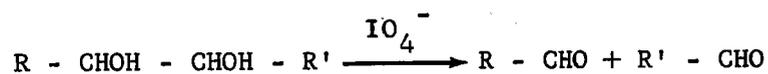
### 3°) Hydroxylation par l'acide peracétique

L'action d'un peracide sur une double liaison conduit à la formation d'un dérivé dihydroxylé :



Mode opératoire d'après (59) : Environ 500 mg de cire sont traités par l'acide peracétique formé in situ par action de 50 ml d'eau oxygénée à 110 volumes sur 40 ml d'acide acétique pur en présence de 1 ml de  $H_2SO_4$  concentré. La température du mélange réactionnel est maintenue à 40°C. La décoloration est très lente et nécessite un temps de réaction de deux semaines. Les produits de l'hydroxylation, extraits à l'éther,

sont lavés avec une solution de bisulfite de sodium, afin de détruire les peracides et autres peroxydes, puis saponifiés pour libérer les hydroxyles qui peuvent se présenter sous forme d'esters de l'acide acétique. Un traitement final par le métaperiodate de sodium dans la pyridine aqueuse à 40 % devrait fournir des aldéhydes ou des cétones par coupure du diol formé :



L'analyse par CPV des dérivés méthylés ne conduit, comme pour les essais de dégradation précédents, à aucune modification du chromatogramme.

#### 4°) Commentaires

Les diverses tentatives de dégradation de notre cire, qui devraient conduire à l'apparition de composés de plus faible masse molaire, n'ont permis de caractériser aucune substance nouvelle par CPV : la répartition et le pourcentage des esters méthyliques élués (environ 25 % de l'échantillon analysé) ne sont pas modifiés après les diverses attaques. D'autre part, la masse molaire moyenne des produits de l'ozonolyse (645) ou de l'hydroxylation suivie d'une attaque périodique (490) reste élevée.

Il ne semble donc pas qu'il y ait eu production de composés de plus faibles masses molaires. Cela pourrait provenir de l'ouverture de doubles liaisons de composés cycliques.

Il est possible également que la décoloration obtenue provienne de l'oxydation d'autres fonctions ne donnant pas lieu à des réactions de coupure. Signalons d'ailleurs que les substances décolorées se recolorent assez facilement sous l'action de la chaleur, même à partir de 80°C.

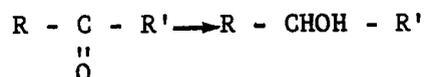
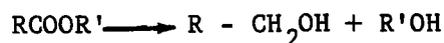
## II - HYDROGENATION DE LA CIRE BRUTE ET DE LA CIRE ACIDE

### 1°) But recherché

Les méthodes d'oxydation ne nous ayant pas donné de résultats intéressants, nous avons essayé de réduire la polarité des substances présentes dans nos cires. En réalisant l'hydrogénolyse des diverses fonctions oxygénées, nous avons tenté de déterminer le squelette des substances réfractaires à l'analyse par CPV.

### 2°) Réduction par $\text{LiAlH}_4$

La réduction des fonctions ester, acide et cétone en fonction alcools est réalisée en faisant bouillir sous reflux pendant 3 heures 200 mg de cire dans l'éther anhydre en présence de 3g de  $\text{LiAlH}_4$ . Le mélange réactionnel est ensuite versé dans un excès d'acide chlorhydrique contenant de la glace et on laisse reposer une nuit, afin de détruire les complexes formés avec l'aluminium. Les cires ainsi réduites sont extraites à l'éther. Leur spectre IR montre la disparition de l'absorption dans la région  $1750-1700 \text{ cm}^{-1}$ , confirmant ainsi la réduction des diverses fonctions oxygénées selon les réactions :



Les acides gras normaux sont donc réduits en alcools gras normaux.

L'analyse par CPV des produits de la réduction de la cire acide par  $\text{LiAlH}_4$ , acétylés par l'anhydride acétique, permet de mettre en évidence les alcools gras de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$  correspondant aux acides gras décrits précédemment. La proportion des alcools identifiés dans la cire acide réduite, ainsi que leur répartition en fonction de la longueur de chaîne, sont identiques à celles des acides gras. Une saponification incomplète de la cire acide aurait pu être mise en évidence de cette manière, puisque la réduction par  $\text{LiAlH}_4$  provoque la rupture des fonctions esters avec production de deux alcools. Les résultats obtenus montrent qu'il n'en est rien et que seulement 22 % de la cire acide, réduite ou non, sont identifiables par CPV.

### 3°) Hydrogénolyse de dérivés iodés

Les cires réduites par  $\text{LiAlH}_4$  sont traitées pendant une heure à  $100^\circ\text{C}$  par l'iode en présence de phosphore rouge et en l'absence d'eau. Dans ces conditions les fonctions alcools sont transformées en dérivés iodés. L'hydrogénation de ces dérivés iodés par  $\text{LiAlH}_4$  fournit les hydrocarbures correspondants (60). L'analyse par CPV des hydrocarbures ainsi obtenus à partir de la cire brute permet d'identifier les n-alcanes de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$ . Ceux-ci constituent environ 40 % de l'échantillon introduit dans le chromatographe et leur répartition est analogue à celle des acides gras. On peut donc penser que compte non tenu des pertes éventuelles dues aux nombreuses manipulations, la cire brute contient environ 40 % de composés à longue chaîne possédant de 16 à 34 atomes de carbone.

#### 4°) Méthode universelle de Berthelot

##### a) Principe et mode opératoire

La méthode dite universelle de Berthelot (61) permet, en principe, de réaliser l'hydrogénation totale d'un composé, et par conséquent de parvenir à réduire les constituants des cires en hydrocarbures en une seule étape.

La réduction de 100 mg de cire est effectuée par 1 ml de HI à 57 % pendant 15 heures à 240°C en tube scellé. Les cires ainsi traitées sont extraites au benzène. La phase benzénique est lavée avec 10 ml d'une solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  à 5 %, puis avec de l'eau.

##### b) Résultats

###### b1) Identification d'alcane normaux dans les cires réduites par HI.

L'analyse par CPV d'un échantillon de cire brute ainsi réduite permet de mettre en évidence les n-alcane de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$ , par comparaison avec des n-alcane de référence. En utilisant le n-heptadécane comme étalon interne, nous avons déterminé que, dans les cas les plus favorables, le taux de n-alcane élués est de l'ordre de 40 % de l'échantillon injecté. La répartition de ces n-alcane en fonction de la longueur de chaîne est semblable à celle des acides gras.

Afin de contrôler le rendement des réductions effectuées, nous avons méthylé les divers échantillons de cire traités par HI. L'analyse par CPV des cires réduites puis méthylées, en programmation de température, dans les conditions utilisées pour la détermination quantitative des

acides gras (voir chap. III, § I, 3), permet de déceler, à côté des n-alcanes résultant de l'action de HI, des acides gras non réduits. Bien que, dans ces conditions, l'analyse quantitative soit délicate, à cause du chevauchement partiel des différents pics correspondant aux n-alcanes et aux esters méthyliques d'acides gras, l'observation des chromatogrammes montre que le rendement de la réduction est variable suivant les essais, même lorsqu'on prolonge la durée de la réaction jusqu'à 24 heures. Néanmoins, dans les cas les plus favorables, les pics correspondant aux esters méthyliques d'acides gras sont négligeables par rapport aux pics correspondant aux n-alcanes.

Les variations du rendement de la réduction pourraient s'expliquer par l'insolubilité des cires dans HI : elles se présentent, après action de HI, sous forme d'un agglomérat collé contre les parois du tube. Un meilleur résultat serait peut-être obtenu s'il était possible d'effectuer l'attaque des cires finement divisées, par exemple en solution dans un solvant organique tel que l'hexane, non susceptible d'être réduit par HI. La nécessité de sceller le tube à réaction à l'aide d'un chalumeau exclut cette possibilité.

b<sub>2</sub>) Réduction par HI de la cire acide réduite au préalable par LiAlH<sub>4</sub>.

Afin d'éliminer la difficulté d'obtenir la réduction totale des acides gras par HI, nous avons effectué la réduction des groupements -COOH de la cire acide par LiAlH<sub>4</sub> avant attaque iodhydrique. Les résultats de l'analyse chromatographique montrent que les n-alcanes de C<sub>16</sub> à C<sub>34</sub> obtenus constituent, comme précédemment, 40 % de l'échantillon injecté.

### III - REDUCTION DE L'ELUAT B PAR HI

Nous avons également traité par HI l'éluat B obtenu par chromatographie sur gel de silice (voir chap. III, § II). Bien que les cires de cet éluat B ne contiennent pas d'acides gras normaux, la réduction par HI produit environ 15 % de n-alcanes de C<sub>18</sub> à C<sub>34</sub> ayant une répartition analogue à celle des acides gras (voir tableau IX). On peut cependant noter que le taux de n-alcanes à nombre impair d'atomes de carbone est supérieur à celui observé dans la répartition des acides gras.

n	$\frac{100 \text{ Si}}{\sum \text{Si}}$	n	$\frac{100 \text{ Si}}{\sum \text{Si}}$
18	4,0	27	3,8
19	0,8	28	15,8
20	2,5	29	2,1
21	0,9	30	3,1
22	15,1	31	0,9
23	3,0	32	0,9
24	17,7	33	0,8
25	4,2	34	0,5
26	20,1	autres	3,8
TOTAL : 100 %			

TABLEAU IX : Répartition des n-alcanes obtenus après réduction de l'éluat B par HI en fonction de la longueur de chaîne.

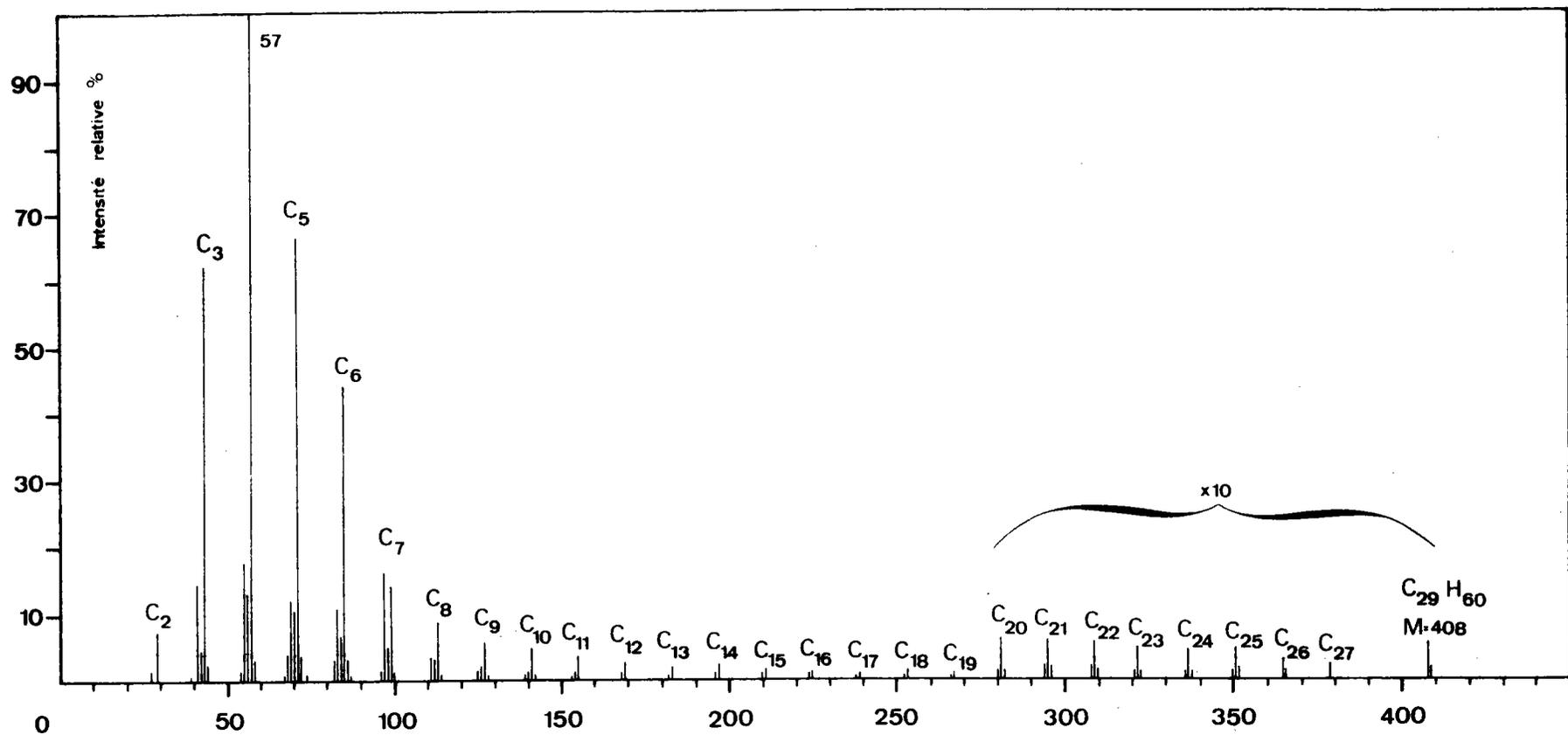


Fig. 35: Exemple de spectre de masse obtenu après réduction de la cire par HI et couplage CPV-SM : n-nonacosane.

#### IV - SPECTROMETRIE DE MASSE

Les n-alcane obtenus après action de HI ont également été identifiés par couplage CPV-SM. Le spectre de masse d'un n-alcane donné est bien plus simple que celui d'un ester méthylique d'acide gras. Les ions les plus importants sont les ions de la série  $C_n H_{2n+1}$ . Le pic  $m/e = 57$  ( $n = 4$ ) est le pic de base. A partir de  $n > 4$  l'intensité de ces pics décroît régulièrement lorsque  $n$  augmente. Aux  $m/e$  élevées on trouve le pic de l'ion moléculaire  $C_n H_{2n+2}$ . L'introduction de tout substituant alkyle dans la molécule produit un effet prononcé sur le spectre de masse, avec l'apparition d'irrégularités dans la série  $C_n H_{2n+1}$  (62). Les spectres de masse obtenus avec nos cires réduites par HI sont essentiellement ceux d'alcane normaux. Comme exemple nous donnons le spectre de masse du n-nonacosane ( $n = C_{29}$ ) (fig. 35).

L'étude par introduction directe dans le spectromètre de masse de la cire brute ou de l'éluat B traités par HI ne nous a pas fourni de renseignements supplémentaires sur les substances non identifiées par CPV.

#### V - CONCLUSION

Les méthodes de dégradation oxydative appliquées à nos cires ne nous ont pas permis d'obtenir des substances facilement identifiables. Les méthodes d'hydrogénation semblent plus prometteuses, puisque nous sommes parvenus à montrer qu'environ 40 % des substances contenues dans la cire acide ont une longueur de chaîne comprise entre 16 et 34 atomes de carbone (dont environ 22 % d'acides gras normaux). D'autre part, au moins 15 % des substances de l'éluat B (soit 6,7 % de la cire acide) possèdent également 16 à 34 atomes de carbone. Il est possible qu'en améliorant la technique

d'hydrogénation, ou peut-être en effectuant l'hydrogénolyse catalytique des cires dans l'injecteur du chromatographe, on puisse montrer qu'il en est de même pour tous les composés de l'éluat B.

## C O N C L U S I O N S   G E N E R A L E S

A la suite de nombreux travaux sur les cires ou bitumes extraits de tourbes d'origines très diverses, qui ont permis de mettre en évidence essentiellement des acides gras normaux, nous nous sommes intéressé à notre tour (63) aux cires d'une tourbe commerciale et de l'acide humique extrait de cette tourbe. Ces cires, obtenues par extraction à l'éther éthylique bouillant, n'avaient jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude.

Les méthodes classiques d'analyse des graisses et des huiles (indice de saponification, d'iode, d'hydroxyle, etc) ne nous ont fourni que peu de renseignements, en raison de la complexité du mélange et des difficultés à adapter ces méthodes à l'étude des cires. Nous pouvons néanmoins déduire de la mesure des différents indices la composition approximative suivante : la cire brute, de masse molaire moyenne voisine de 1000 et contenant environ 0,5 fonction ester et 1 fonction acide par kg, libère après saponification : d'une part, 23 % d'insaponifiable de masse molaire moyenne 480 ; d'autre part, 77 % de cire acide de masse molaire moyenne 680 et dont l'acidité rapportée à 1 kg est de 2,1 équivalents. La composition centésimale des cires montre qu'il s'agit de composés relativement plus riches en oxygène et moins en hydrogène qu'un acide gras normal. La mesure de l'indice d'iode semble de plus indiquer la présence de doubles liaisons.

L'étude spectroscopique de la cire acide (IR, RMN) montre qu'il s'agit principalement de composés à longue chaîne, peu ramifiés, possédant une fonction acide carboxylique et sans doute des groupements hydroxyles. L'insaponifiable présente également une structure à longue chaîne mono ou polyhydroxylée.

L'analyse, par chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés de la cire acide, nous a permis d'identifier des acides gras ayant de 16 à 34 atomes de carbone. Par couplage de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse, nous avons montré que ces acides sont essentiellement des acides gras saturés linéaires. Les acides gras insaturés ou ramifiés, ne possédant pas d'autres groupements fonctionnels, ainsi que les acides gras monohydroxylés, sont présents en faibles proportions, voire absents. Par contre, nous avons pu détecter par spectrométrie de masse de faibles quantités de diacides normaux en  $C_{22}$ ,  $C_{24}$  et  $C_{26}$ .

L'analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse montre que les acides gras identifiés constituent environ 22 % de la cire acide, soit 1,1 % de l'acide humique et 0,4 % de la tourbe. Les acides à nombre pair d'atomes de carbone sont prédominants, en particulier les acides tétracosanoïque ( $C_{24}$ ) et hexacosanoïque ( $C_{26}$ ) : cette répartition des acides gras en fonction du nombre d'atomes de carbone rejoint les résultats obtenus par d'autres auteurs à partir de tourbes ou d'acides humiques d'origines très différentes (2, 25, 26, 28, 37, 38). Notons que les acides en  $C_{24}$  et  $C_{26}$  sont assez rarement rencontrés dans les huiles ou les graisses, dans lesquelles les acides en  $C_{16}$  et  $C_{18}$  sont les plus fréquents.

Par suite de leur faible volatilité ou de leur instabilité thermique, il n'est pas possible d'identifier directement par CPV ou par spectrométrie de masse les autres composés contenus dans la cire acide. L'analyse thermogravimétrique sous vide de la cire acide méthylée montre d'ailleurs qu'une fraction de 30 % seulement est susceptible de se volatiliser.

Par chromatographie sur gel de silice, à l'aide d'éluants de polarité croissante, nous avons réussi à séparer les constituants de la cire en plusieurs groupes de composés. Une première fraction (éluat A) représente 25 % de la cire acide et contient les acides gras volatils déjà identifiés par CPV. La seconde (éluat B) est la plus importante (environ 50 % de la cire acide). Les spectres IR et RMN et les masses molaires moyennes des deux fractions A et B sont comparables, mais l'éluat B est plus riche en oxygène et ne se prête pas à l'analyse par CPV. Le taux d'oxygène augmente d'ailleurs en même temps que la masse molaire dans les quatre dernières fractions éluées, qui ne représentent ensemble que 25 % de la cire acide.

Dans l'espoir de réduire la longueur de chaîne des composés de la cire acide, par coupure au niveau d'éventuelles doubles liaisons, nous avons soumis la cire à diverses réactions de dégradation : ozonolyse, hydroxylation par l'acide peracétique et coupure du diol formé par  $\text{HIO}_4$ , dégradation oxydative par  $\text{HIO}_4$  en présence de  $\text{KMnO}_4$ . On observe alors une très nette diminution de l'indice d'iode et de la coloration. L'analyse par CPV des produits d'oxydation ne fait apparaître aucun changement dans les chromatogrammes, aussi bien qualitatif que quantitatif. Cela peut provenir, soit de coupure en fin de chaîne, soit de l'ouverture de cycles, soit de l'existence de réactions secondaires n'entraînant pas de réactions de coupure.

Afin de réduire la polarité des composés et de déterminer leur squelette, nous avons entrepris d'effectuer l'hydrogénolyse des diverses fonctions oxygénées, par l'utilisation de deux méthodes différentes.

D'une part, l'action de  $\text{LiAlH}_4$  permet de réduire les fonctions ester, acide et éventuellement cétone en fonctions alcools : de cette manière, après acétylation des alcools obtenus par réduction de la cire acide, nous avons retrouvé environ 22 % d'alcools gras de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$  correspondant aux acides gras précédemment identifiés. La plupart des substances réduites sont donc encore trop polaires pour être analysées par CPV. Un traitement par l'iode en présence de phosphore rouge permet de transformer les alcools en dérivés iodés, qui, après une nouvelle réduction par  $\text{LiAlH}_4$ , fournissent les hydrocarbures correspondants. Notre expérience montre que le rendement de ces opérations successives est de l'ordre de 40 %, aussi bien à partir de la cire acide que de la cire brute : nous avons donc obtenu au total environ 40 % de n-alcanes de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$ , dont la répartition en fonction du nombre d'atomes de carbone est voisine de celle des acides gras, avec toutefois une légère augmentation de la proportion des termes à nombre impair d'atomes de carbone.

D'autre part, l'action de HI à 57 % ( $d = 1,7$ ) en tube scellé à  $240^\circ\text{C}$ , permet, en principe, de réaliser l'hydrogénation totale des substances en une seule étape (méthode universelle de Berthelot). Le rendement de cette méthode est variable d'un essai à l'autre. Dans les cas les plus favorables, le rendement en n-alcanes de  $\text{C}_{16}$  à  $\text{C}_{34}$  à partir de la cire brute ou acide, est comme précédemment de l'ordre de 40 %. Il apparaît donc qu'au moins 18 % des substances présentes dans nos cires ont, comme les acides gras, une longueur de chaîne variant entre 16 et 34 atomes de carbone, avec un maximum pour les termes en  $\text{C}_{24}$  et  $\text{C}_{26}$ . Cette méthode, appliquée à l'éluat B qui ne contient pas d'acides gras normaux, permet de mettre en évidence la même série de n-alcanes avec un rendement d'au

moins 15 %. La réduction des composés contenus dans nos cires en hydrocarbures n'est donc pas aussi complète qu'on pouvait l'espérer. Du fait qu'aucun autre type d'hydrocarbures que les n-alcane de  $C_{16}$  à  $C_{34}$  ne soit apparu en quantité notable après réduction des cires, nous pensons néanmoins que l'ensemble des substances contenues dans les éluats A et B ont un squelette linéaire ayant de 16 à 34 atomes de carbone. Il est possible, qu'avec des méthodes que nous n'avons pu mettre en oeuvre jusqu'à présent pour des raisons d'ordre matériel, on puisse parvenir à l'identification définitive des composés complexes contenus dans ces cires : pyrolyse dans l'injecteur du chromatographe, hydrogénation catalytique dans l'injecteur du chromatographe, chromatographie sous pression.

Ce travail confirme donc la présence universelle des acides gras à longue chaîne dans les matières fossiles et constitue une première étape pour la détermination de la structure des substances complexes, très oxygénées, extractibles à l'aide de solvants organiques de la matière vivante en cours de fossilisation.

## A N N E X E S

ANNEXE I : Préparation de l'acide humique.

On traite environ 900 g de tourbe par agitations répétées avec HCl 2,5 N, afin d'extraire les minéraux. L'acide humique est ensuite extrait de la tourbe par trois traitements successifs avec de l'ammoniaque 2N. Les liqueurs ammoniacales sont amenées à pH 1 par HCl concentré. L'acide humique précipite. Il est soigneusement lavé à l'eau, puis on le soumet à une électrodialyse prolongée, jusqu'à l'obtention d'un courant de l'ordre de 2 à 3 mA. Le rendement en acide humique est de 7 %.

ANNEXE II : Indice d'iode.

Réactifs : A : 1,27 g d'iode et 0,80 g de brome dissous dans 100 ml d'acide acétique pur.

B : Solution acétique à 2,5 % d'acétate mercurique.

Mode opératoire :

La prise d'essai d'environ 0,1 g est dissoute dans 10 ml de chloroforme. On ajoute 10 ml de réactif A fraîchement préparé et 5 ml de réactif B. On agite. Après cinq minutes, on ajoute 10 ml d'une solution d'iodure de potassium à 10 % et 20 ml d'eau. On neutralise par  $\text{NaHCO}_3$  et titre par  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  N/10. On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Essai à blanc : n ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  N/10

Essai avec m g de substance : N ml de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  N/10

Indice d'iode =  $\frac{(N-n) \times 1,27}{m}$

ANNEXE III : Indice de méthoxyle.

Matériel : l'appareil en pyrex pour le dosage des alcoxyles comprend trois parties assemblées par des rodages : un tube à réaction ; un laveur et un absorbeur (voir réf. 40, p. 165).

Réactifs :

- acide iodhydrique à 57 % (d = 1,7) stabilisé par 0,3 % d'acide hypophosphoreux.
- tampon acéto-acétique, pH = 3,5.
- acide formique à 80 %.
- acide sulfurique dilué au 1/5.
- solution d'iodure de potassium à 10 g/l.
- thiosulfate de sodium à 50 g/l.
- solution de sulfate de cadmium à 50 g/l.
- solution molaire de chlorure de sodium.
- solution titrante de thiosulfate de sodium 0,05N.

Mode opératoire :

- peser précisément environ 100 mg de cire et les introduire dans le tube à réaction.
- introduire dans le laveur 1 ml de solution de NaCl, 2 ml de solution de thiosulfate de sodium et 2 ml de solution de sulfate de cadmium.
- introduire dans l'absorbeur environ 10 ml de tampon acéto-acétique et 10 gouttes de brome.
- ajouter dans le tube à réaction 6 gouttes d'anhydride acétique et 4 ml d'acide iodhydrique à 57 %. Adapter rapidement le tube au montage.
- l'iodure de méthyle formé devant être entraîné par un courant d'azote, régler le débit à 2 ou 3 bulles par seconde.

- chauffer au bain de sable pendant une heure.
  - vider le contenu des absorbeurs dans un erlen rodé de 250 ml et les rincer avec un peu d'eau. Joindre les eaux de lavage à la première liqueur.
- Ajouter 1 g d'acétate de sodium. Décolorer la solution en versant goutte à goutte de l'acide formique, puis ajouter un excès d'iodure de potassium et d'acide sulfurique. Laisser reposer 5 minutes à l'abri de la lumière, erlen bouché. Doser par le thiosulfate de sodium 0,05N en présence d'empois d'amidon.

L'indice de méthoxyle exprimé en méquiv./g est donné par :

$$\frac{(n-n') \times 0,05}{6 m}$$

n : nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,05N versés pour l'essai.

n' : nombre de ml de thiosulfate de sodium 0,05N versés pour l'essai à blanc effectué dans les mêmes conditions.

m : poids de la prise d'essai en g.

#### ANNEXE IV : Méthylation de la cire.

1 g de cire acide dissoute dans 300 ml d'un mélange benzène-méthanol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré (10-10-0,5), est chauffé sous reflux pendant une heure. Après refroidissement, le mélange est lavé à l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage et séché sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre.

#### ANNEXE V : Indice d'hydroxyle.

Réactif : 15 ml d'anhydride acétique dans 30 ml de pyridine anhydre.

Mode opératoire :

Dans un ballon mettre 5 ml de réactif mesurés à la pipette et 1 g de cire. Dans un autre ballon on met la même quantité de réactif (essai à blanc). Agiter, puis chauffer sous reflux pendant une heure. Ajouter 10 ml d'eau dans chaque ballon par le réfrigérant et chauffer encore pendant 10 minutes. Laisser refroidir. Ajouter dans chaque ballon 25 ml de butanol dont une moitié pour rincer le réfrigérant et l'autre pour laver les parois des ballons. Titrer par la soude alcoolique N en présence de phénolphtaléine.

Soit  $n'$  ml versés pour l'essai à blanc, et  $n$  ml versés pour le dosage effectué sur  $m$  g de cire. L'indice d'hydroxyle en méquiv. OH par g de cire est donné par :

$$a + \frac{n - n'}{m}$$

où  $a$  est l'acidité de 1 g de cire.

ANNEXE VI : Indice de carbonyle.

Réactif : à 9 g de chlorhydrate d'hydroxylamine ajouter 40 ml d'eau distillée, puis compléter à 800 ml avec de l'éthanol à 95°. Ajouter à cette solution tout en agitant, 600 ml d'alcool contenant 3,6 g de potasse et 10 ml de solution de bleu de bromophénol (solution à 0,04 % dans l'alcool). Filtrer le réactif.

Mode opératoire : à 1 g de cire ajouter 50 ml de réactif. Chauffer sous reflux pendant une heure. Laisser refroidir et titrer par HCl N/20. Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Soient  $n$  et  $n'$  les volumes d'acide utilisés pour le dosage effectué sur  $m$  g de cire et l'essai à blanc. L'indice de carbonyle, exprimé en méquiv. C = O par g de cire, est donné par :

$$\frac{n - n'}{20m}$$

ANNEXE VII : Préparation de sels de baryum.

A environ 100 mg de cire acide dissoute dans 30 ml de méthanol bouillant on ajoute goutte à goutte 30 ml d'une solution de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  à 1 % dans le méthanol et  $\text{NH}_3$  concentrée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus formation de précipité. On centrifuge et lave deux fois le précipité avec 30 ml de méthanol bouillant, puis au chloroforme bouillant. Le précipité est ensuite séché à  $110^\circ\text{C}$ .

## B I B L I O G R A P H I E

-----

- (1) EGLINTON G. and MURPHY M. T. J. ed. "Organic Geochemistry".  
Springer-Verlag Berlin 1969.
- (2) IKAN R. et coll. "Constituents of Huleh peat. III. Acids".  
Israel J. of Chem. 1968, 6, p. 485-489.
- (3) MENEGHEL R., PETIT-SARLOTTE C. et BLOCH J.M.  
Analyt. Letters, 1971, 4 (6), p. 317.
- (4) MENEGHEL R., PETIT-SARLOTTE C. et BLOCH J.M.  
Bull. Soc. chim. Fr., 1972, 7, p. 2997.
- (5) HUBLER J.C. et BLOCH J.M.  
C.R. Acad. Sci., 1972, 274, p. 514.
- (6) BREGER I.A. "Organic Geochemistry". Pergamon press. Oxford 1963.
- (7) RYAN H. et DILLON T. "On Montanin and Montana (Montan) waxes".  
Sci. Proc. Roy. Dub. Soc. 1909, 12, p. 202-209.
- (8) TITOW N. "Über die Bitumina des Sphagnumtorfes".  
Brennstoff Chemie, 1932, 13, p. 266-269.
- (9) RAKOWSKI E.W. et EDELSTEIN N.G. "Die Torfbitumina, I, Fettsäuren".  
Brennstoff Chemie, 1932, 13, p. 46-49.
- (10) ROGINSKAYA E.V. J. of Appl. Chem. (URSS), 1936, 9, p. 108-111.
- (11) REILLY J. et WILSON J.P. "The cerotic and carboceric acid fractions  
of Mona Wax". Sci. Proc. Roy. Dub. Soc. 1940, 22, n° 34, p. 321-326.
- (12a) REILLY J., KILBRIDE D.A. et WILSON J.P.  
"The isolation of Behenic Acid From Refined Mona Wax".  
Biochem J. 1943, 37, p. 195-197.

- (12b) CARLISLE C.H. et CROWFOOT D. Biochem J., 1943, 37, p. 197-198.
- (13) VOLAROVICH M.P. et GUSEV K.F.  
"X-ray studies of the structure of peat bitumens and waxes".  
Kolloid. Zh., 1956, 18, p. 643-646. Chem. Abstr. 51 6980 a.
- (14) KAGANOVICH F.L. et coll. "Composition of peat wax". Tr. Inst. Torfa, Akad. Nauk Belorusk. SSR, 1959, 7, p. 123-130. Chem. Abstr. 55 8815 h.
- (15) BEL'KEVICH P.I. et coll. "A study of the composition of the unsaponifiable part of peat wax by the method of fractional crystallisation". Tr. Inst. Torfa, Akad. Nauk Belorusk. SSR, 1960, 9, p. 274-279. Chem. Abstr. 56, 2666 a.
- (16) BEL'KEVICH P.I. et coll. Akad. Nauk Belorusk. SSR Inst. Torfa, 1962, p. 173-176. Chem. Abstr. 58, 8817.
- (17) BEL'KEVICH P.I. et coll. Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk, 1963, p. 112-115. Chem. Abstr. 58, 10011 d.
- (18) BEL'KEVICH P.I. et coll. Kompleksn. Ispol'z. Torfa, Vses. Nauchn. Issled. Inst. Torfa, 1965, p. 73-81. Chem. Abstr. 64, 7929 c.
- (19) THOMAS J.D.R. "Chemistry of peat bitumens : fractionation and infrared studies". J. Appl. Chem., 1962, 12, p. 289-294.
- (20) KWATOWSKI A. "Chromatographic analysis of peat bitumens". Zeszyty Nauk Politech. Gdansk., Chem. 1963, 33, (5), p. 29-51. Chem. Abstr. 60, 5242 c.
- (21) KWATOWSKI A. "Composition of resin components of peat bitumens". Valtion Tek. Tutkimuslaitos, Julkaisu, 1965, 93.
- (22) SUNDGREN A. et RAUHALA V.T. "Preliminary note on fatty acids of peat". Suomen Kem. 1949, B 22, p. 24-32.

- (23) SUNDGREN A. et RAUHALA V.T. J. Am. Oil Chem. Soc., 1952, 29, p. 611.
- (24) RAUHALA V.T. "On free hydroxy acids of peat wax".  
J. Am. Oil Chem. Soc., 1961, 38, p. 233-235.
- (25) SUNDGREN A. et RAUHALA V.T. "On free acids of peat wax".  
Valtion Tek. Tutkimuslaitos Julkaisu, 1965, 92.
- (26) MORRISON R.I. et BICK W. "The wax fraction of soils : separation and determination of some components".  
J. Sci. Food Agr., 1967, 18, p. 351-355.
- (27) MORRISON R.I. et BICK W. "Long chain methyl ketones in soils".  
Chem. and Ind., 1966, 14, p. 596-597.
- (28) IVANOVA et coll. Vestsi Akad. Navuk Belarus. SSR, Ser. Khim. Navuk, 1968, 4, p. 121-125. Chem. Abstr. 70, 79824 y.
- (29) IVES D.A.J. et O'NEILL A.N.  
"The chemistry of peat. Part I. The sterols of peat moss (Sphagnum)".  
Can. J. Chem., 1958, 36, p. 434-439.
- (30) IVES D.A.J. et O'NEILL A.N. "The triterpenes of peat moss".  
Can. J. Chem., 1958, 36, p. 926-930.
- (31) Mc LEAN J. et coll. "Triterpenoids from peat".  
Chem. and Ind., 1958, p. 1515-1516.
- (32) IKAN R. et KASHMAN J.  
"Steroids and triterpenoids of Hula peat as compared to other humoliths". Israel J. of Chem., 1963, 1, p. 502-508.
- (33) GILLILAND M.R. et coll. "Polycyclic hydrocarbons in crude peat wax".  
Chem. and Ind., 1960, p. 1357-1358.
- (34) BERGMANN E.D. et coll. "The occurrence of perylene in Huleh peat".  
Israel J. of Chem., 1964, 2, n° 4, p. 171-172.

- (35) RAITSIINA et coll. Vestsi Akad. Navuk Belarus. SSR, Ser. Biyal Navuk, 1971, 2, p. 115-117. Chem. Abstr. 75, 34539 w.
- (36) OGNER G. et SCHNITZER M.  
"The occurrence of alkanes in fulvic acid, a soil humic fraction".  
Geochim. Cosm. Acta, 1970, 34, p. 921-928.
- (37) SCHNITZER M. et OGNER G.  
"The occurrence of fatty acids in fulvic acid, a soil humic fraction".  
Israel J. of Chem., 1970, 8, n° 3, p. 505-512.
- (38) KHAN S.U. et SCHNITZER M.  
"The retention of hydrophobic organic compounds by humic acid".  
Geochim. Cosm. Acta, 1972, 36, n° 7, p. 745-754.
- (39) ASSELINEAU J. "Les lipides bactériens". HERMANN, Paris, 1962.
- (40) PESEZ M. et POIRIER P. "Méthodes et réactions de l'analyse organique".  
Tome 1. MASSON, 1952.
- (41) LUGOWSKA M. et MACHTINGER M.  
Bull. Soc. Chim. Fr., 1968, 12, p. 5084.
- (42) Annales de Biologie Clinique, 1968, n° 7-9, p. 915.
- (43) FLEURY P. "Fiches techniques de chimie biologique". Sang 3 ter 1949.
- (44) BELLAMY L.T. "Spectra of complex molecules".  
Ed. WILEY J., New-York, 1964.
- (45) JAMES A.T. et MARTIN J.P. Biochem. J., 1952, 50, p. 679-690.
- (46) BURCHFIELD H.P. et STORRS E.E.  
"Biochemical applications of gas chromatography".  
Chap. 7. Academic Press, London, 1962.
- (47) BERTHUIS R.K. et coll. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 72, p. 616-632.

- (48) KHAN M.A. et WHITHAM B.T.  
J. Appl. Chem., 1958, 8, p. 549-552.
- (49) GOLD H.J., Anal. Chem.,  
1962, 34, p. 174.
- (50) TRANCHANT J. "Manuel Pratique de Chromatographie en phase gazeuse".  
MASSON, 1968.
- (51) RYHAGE R. et STENHAGEN E. "Mass spectrometry of long-chain esters".  
Chap. 9 dans "Mass Spectrometry of Organic Ions" F.W. Mc LAFFERTY.  
Academic Press, New-York, 1963.
- (52) RYHAGE R. et STENHAGEN E.  
Arkiv. Kemi, 1959, 13, p. 523-542.
- (53) RYHAGE R. et STENHAGEN E.  
Arkiv. Kemi, 1960, 15, p. 291-315.
- (54) RYHAGE R. et STENHAGEN E.  
Arkiv. Kemi, 1960, 15, p. 333.
- (55) BIEMANN K. "Mass spectrometry". Chap. 4, § 3.  
Mc. GRAW-HILL book company, inc. New-York, 1962.
- (56) RYHAGE R. et STENHAGEN E.  
Arkiv. Kemi, 1959, 14, p. 497.
- (57) PRIVETT O.S. Chap. III dans "Progress in the chemistry of Fats and  
other Lipids", vol IX, part. 1,  
R.T. HOLMAN éd. PERGAMON PRESS Oxford, 1966.
- (58) VON RUDLOFF E. "Periodate-permanganate oxidations",  
Can. J. Chem., 1956, 34, p. 1413.

- (59) SWERN D. "Epoxidation and hydroxylation of ethylenic compounds with organic peracids", *Org. Reactions*, 1953, 7, p. 378.
- (60) DOWNING D.T. et coll., *Australian J. Chem.* 1960, 13, p. 80-94.
- (61) BERTHELOT M. "La synthèse chimique",  
Librairie GERMER BAILLIÈRE et Cie, Paris, 1883.
- (62) O'NEAL M.J., Jr et WIER T.P., Jr. "Mass spectrometry of heavy hydrocarbons". *Anal. Chem.*, 1951, 23, n° 6, p. 830-843.
- (63) WILHELM J.C. et BLOCH J.M.  
"Etude de la nature et de la structure des cires de tourbes et d'acides humiques".  
*C.R. Acad. Sci.*, 1973, 276, p. 1481-1484.