HAL
open science

Contribution à l'étude des substances à caractère lipidique extraites de tourbes et de sols hydromorphes

Jean-Claude Wilhelm

To cite this version:

Jean-Claude Wilhelm. Contribution à l'étude des substances à caractère lipidique extraites de tourbes et de sols hydromorphes. Chimie. Université Paul Verlaine - Metz, 1986. Français. NNT : 1986METZ022S . tel-01775556

HAL Id: tel-01775556

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775556v1

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE METZ

U.E.R. SCIENCES EXACTES ET NATURELLES

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR D'ETAT
ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN-CLAUDE WILHELM
MAÎTRE DE CONFÉRENCES À L'UNIVERSITÉ DE METZ

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19860445
Cote S/M3 86/22
Loc Magasin

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES SUBSTANCES A CARACTERE LIPIDIQUE EXTRAITES DE TOURBES ET DE SOLS HYDROMORPHES

UNIVERSITE DE METZ BIBLIOTHEQUE

SOUTENUE LE 12 DÉCEMBRE 1986 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

M. J.M. BLOCH	: PROFESSEUR ÉMÉRITE À L'UNIVERSITE DE METZ
MME D. CAGNIANT	: PROFESSEUR À L'UNIVERSITÉ DE METZ
M. P. JAMBU	: CHARGÉ DE RECHERCHES AU C.N.R.S.
M. J.C. LAUER	: CHEF DU SERVICE ANALYTIQUE CDF CHIMIE-LORRAINE
M. M. METCHE	: PROFESSEUR À L'INPL DE NANCY
M. D. PAQUER	: PROFESSEUR A L'UNIVERSITÉ DE METZ

A Jeannine,
ma femme

A mes filles,
Valérie et Sophie

A mes parents

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

Je lui exprime mes plus vifs remerciements pour l'appui et les conseils qu'il m'a toujours prodigués, ainsi que pour l'intérêt qu'il n'a cessé de porter à ce travail après son départ à la retraite.

Je tiens à remercier Madame D. CAGNIANT, Professeur, qui a bien voulu juger ce travail et qui m'a permis de le poursuivre en m'accueillant dans son laboratoire.

J'associe à ces remerciements Monsieur D. PAQUER, Professeur, dont les remarques et les encouragements m'ont été précieux pour la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également Messieurs M. METCHE, Professeur à l'INPL de Nancy, J. C. LAUER, Directeur du Service Analytique CdF-Chimie Lorraine et P. JAMBU, Chargé de recherches au CNRS, d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à mes collègues du LCSO, chercheurs, personnels techniques et administratifs, pour leur accueil chaleureux et leurs encouragements, ainsi qu'à mes amis du Laboratoire de Chimie Minérale pour les années passées ensemble.

Les spectres de masse ont été établis par les soins de Monsieur G. TELLER au service de spectrométrie de masse de la Faculté des Sciences de Strasbourg, ainsi que par Monsieur J.M. ZIEGLER au service commun de Spectrométrie de masse de L'Université de Nancy I. Qu'ils en soient ici remerciés.

Enfin, je ne manquerai pas de remercier les membres du Centre de Pédologie Biologique du CNRS à Nancy qui ont bien voulu s'intéresser à mon travail et, plus particulièrement, Monsieur B. SOUCHIE, ancien Directeur du Centre de Pédologie, Monsieur B. GUILLET pour les prélèvements en forêt de Vitrimont et Monsieur D. LOUSTAU pour les prélèvements à l'étang de Lachaussée.

INTRODUCTION

I- LA TOURBE, MATIERE PREMIERE.

La tourbe est une matière première provenant de la dégradation de végétaux et qui a reçu diverses applications suivant les pays qui en possèdent d'importantes réserves: utilisation comme combustible (URSS, Finlande, Irlande); production de coke pour l'industrie métallurgique (Allemagne, Finlande); produit pour l'horticulture (Allemagne, USA, Canada); production de charbon actif (Irlande, Hollande); source de produits chimiques tels que cires, sucres pour la culture de levures (URSS). Bien que ce dernier point constitue l'utilisation mineure de la tourbe, l'étude chimique des tourbes a fait l'objet de très nombreuses recherches, surtout dans les pays que nous venons de citer. L'ouvrage de C.H. FUCHSMAN (1) peut être considéré comme l'ouvrage de référence dans ce domaine.

La tourbe est un mélange extrêmement complexe de matières organiques, parmi lesquelles subsistent des tissus de végétaux non dégradés, c'est-à-dire les plus stables chimiquement. On trouve quatre types principaux de composés: les "bitumes" obtenus par extraction à l'aide d'un solvant organique neutre; les acides humiques solubles dans les bases minérales (ammoniaque, soude, pyrophosphate de sodium) et qui précipitent en milieu acide; les carbohydrates dérivant de la cellulose; enfin les lignines qui servent de ciment aux fibres végétales.

Nos premières recherches, au Laboratoire de Chimie Minérale et Analytique, concernaient l'acide humique extrait d'une tourbe commerciale "Floratorf" provenant d'Oldenburg (RFA).

Nous nous sommes rapidement rendus compte de la présence de substances à caractère lipidique à différents stades de la préparation ou de la dégradation de l'acide humique. Nous nous sommes alors plus spécialement intéressés à la première catégorie de substances.

II- TERMINOLOGIE

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 (2, p. 581).

Bien qu'on trouve parfois dans la littérature le terme "lipides", les auteurs utilisent généralement le terme "bitumes" pour désigner l'ensemble des substances obtenues par extraction d'un sol (tourbe, lignite, sol de jardin ,etc) à l'aide d'un solvant organique neutre bouillant, sous la pression atmosphérique normale, par exemple l'éther de pétrole ou encore un mélange benzène - méthanol.

Les bitumes sont arbitrairement divisés en "cires", "résines" et "asphaltes". Cette terminologie est empruntée à l'industrie des cires de lignite (Montan Wax), les cires de tourbe étant parfois utilisées 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. (3):

- 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.

Il est évident que l'on trouve dans les cires des composés caractéristiques des résines ou des asphaltes et vice-versa. Ces distinctions ne s'imposent donc pas d'un point de vue strictement analytique.

Notons que dans la terminologie courante les asphaltes et les bitumes désignent les résidus lourds de l'industrie du pétrole et du charbon respectivement.

Ce fractionnement grossier ne présente d'intérêt que dans la préparation industrielle des cires, où l'on cherche à obtenir un taux minimum de 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 lipides et des substances à longue chaîne, il présente l'avantage d'être facilement éliminé à température relativement basse : en effet, les substances extraites peuvent donner lieu à des réactions de polycondensation sous l'effet de la chaleur.

Compte tenu de l'imperfection du fractionnement par différences de solubilité, nous conviendrons d'utiliser le terme "cires" pour désigner l'ensemble des substances extraites à l'éther éthylique bouillant à partir d'une tourbe ou d'un sol.

Nous étudierons trois échantillons :

-tourbe commerciale "Floratorf", pH = 4;

-tourbe de Vitrimont (Meurthe et Moselle), pH = 4;

-anmoor (sol hydromorphe constitué d'un mélange intime de matière organique bien humifiée et de matière minérale) de l'étang de Lachaussée (Meuse), pH = 7.

III- BUT DE NOS RECHERCHES.

Le principal objectif de nos recherches est la détermination qualitative et quantitative des principales substances entrant dans la composition de ce mélange très complexe que nous appelerons désormais cires.

Les principales techniques d'analyse utilisées sont les techniques chromatographiques en phase liquide et gazeuse, spectroscopiques (IR, RMN ^{1}H et ^{13}C) et surtout le couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (voir figure 1).

Sans pour l'instant entrer dans le détail, citons les principales substances identifiées : acides gras, alcools gras, ω-hydroxy-acides, stérols, triterpénoïdes.

Par ailleurs certaines des substances identifiées peuvent servir à caractériser un sédiment, un sol ou une tourbe, car leurs proportions sont susceptibles de variations avec l'âge de l'échantillon et la profondeur à laquelle il a été prélevé. Certains de ces produits peuvent être considérés comme des "fossiles chimiques" ou, terme synonyme, "biomarqueurs", c'est-à-dire qu'ils sont l'indice d'une origine biologique dans un échantillon de géolipides. Ils peuvent donner des informations

sur les processus de dégradation des biolipides. L'absence de certains biomarqueurs peut également être significative (2, chap. 2).

Nous nous proposons de comparer les cires extraites de deux sols acides (tourbes) et d'un sol neutre (anmoor) prélevés à deux profondeurs.

Avant d'aborder la partie analytique de ce travail nous ferons un historique des nombreuses recherches suscitées par les cires de tourbe.

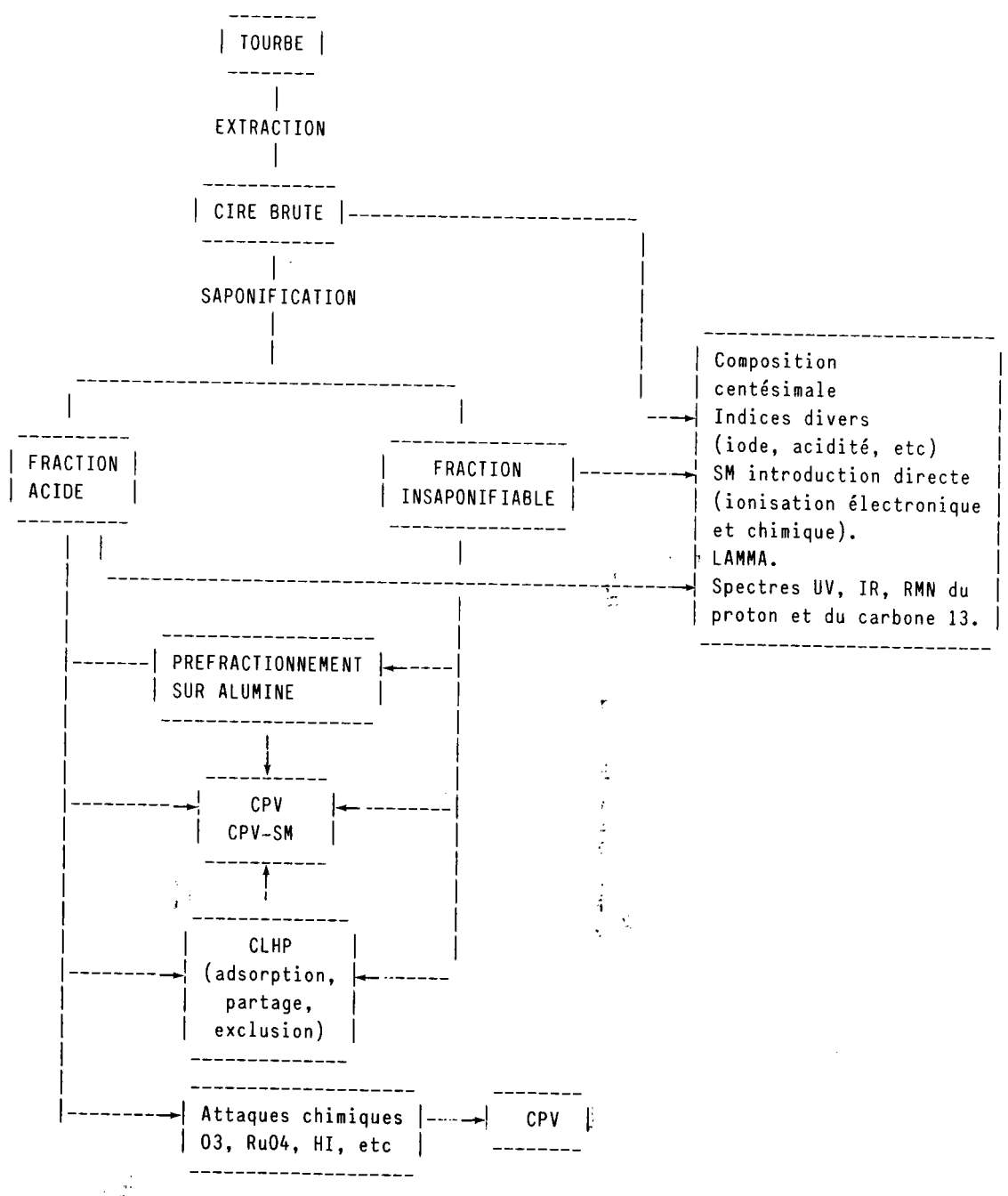


Fig 1: Analyse d'une cire de tourbe. Abréviations: CPV (chromatographie en phase vapeur); SM (spectrométrie de masse); CPV-SM (couplage chromatographie en phase vapeur- spectrométrie de masse); CLHP (chromatographie liquide haute pression); UV (ultra-violet); IR (infra-rouge); RMN (résonance magnétique nucléaire); LAMMA (laser microprobe mass analysis).

CHAPITRE I

HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CIRES DE TOURBE

I- EXTRACTION.

Les solvants utilisés pour extraire les composés à caractère lipidique sont très variés : les hydrocarbures comme l'éther de pétrole, l'hexane, la ligroïne, le toluène, le benzène; les hydrocarbures chlorés comme le chloroforme, le tétrachlorure de carbone; les solvants oxygénés comme l'éther éthylique, le dioxanne, l'acétone, les divers alcools, de l'alcool méthylique à l'alcool amylique; les mélanges de solvants, le plus couramment utilisé étant le mélange benzène-éthanol (cette liste n'est évidemment pas exhaustive). Le pouvoir extractif de ces solvants par rapport au benzène est très variable, par exemple 0,13 pour l'éther de pétrole et de 0,40 à 0,98 pour l'éther éthylique suivant les auteurs (1).

II- COMPOSES A LONGUE CHAINE.

La présence d'hydrocarbures dans la matière fossile est quasi universelle. On trouve principalement des n-alcanes, des stéranes, des triterpènes, et des hydrocarbures à structure isoprénique. Les hydrocarbures aromatiques, moins répandus, dérivent peut-être de stérols ou de terpénoïdes. Les hydrocarbures insaturés (principalement des terpènes), très répandus dans la règne vivant, sont très rares dans la matière fossile (4, chap.12; 2, 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 et les diacides gras sont assez rares (2, chap. 14 ; 4, chap.12).

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_n - COOH$$

Acide iso

$$CH_3 - CH_2 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_n - COOH$$

Acide antéiso

$$CH_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_3 - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - CH_2 - COOH$$

Acide à stucture isoprénique: acide phytanique

Dès 1909 RYAN et coll. (5) étudient une cire commerciale appelée "Montana Wax", probablement obtenue à partir de tourbe. Par saponification et précipitation, ils pensent avoir obtenu l'acide montanique $C_{28}H_{56}O_2$.

TITOW en 1932 (6) étudie les bitumes extraits d'une tourbe de sphaigne provenant d'URSS. Dans la fraction insaponifiable, il note la présence des hydrocarbures $C_{35}H_{72}$ et $C_{33}H_{68}$ et de l'alcool $C_{27}H_{56}O$. Par distillation fractionnée sous vide de la fraction saponifiable des bitumes sous forme d'esters éthyliques, cet auteur pense avoir isolé les acides $C_{25}H_{50}O_2$ et $C_{27}H_{54}O_2$.

RAKOWSKI et coll. en 1932 (7) trouvent les acides $C_{26}H_{52}O_2$, $C_{27}H_{54}O_2$, $C_{28}H_{56}O_2$ dans les cires d'une tourbe extraite des

marais de Redkinski (URSS).

ROGINSKAYA en 1936 (8) 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 coll. en 1940 (9) 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 sous vide, recristallisation) et d'identification (composition centésimale, indice d'iode, indice d'hydroxyle, indice d'acidité, point de fusion) apparaissent aujourd'hui bien insuffisantes pour l'analyse de mélanges aussi complexes, qui semblent, comme on peut le constater, contenir essentiellement des acides gras .

C'est ainsi que REILLY et coll. tentent en 1943 de décolorer la "Mona Wax" par traitement avec CrO_3 dans l'acide acétique. Ils isolent alors de l'acide béhénique $C_{22}H_{44}O_2$ (10). Cet acide est examiné aux rayons X par CARLISLE et coll. (11): 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% d'acide béhénique, ainsi que des traces d'acide lignocérique ($C_{24}H_{48}O_2$).

Les spectres de diffraction par les rayons X obtenus par VOLAROVICH (12) montrent une similitude entre les hydrocarbures aliphatiques saturés et les cires de tourbes. L'auteur attribue les variations du paramètre de la maille élémentaire mesuré à la présence possible d'hydrocarbures cycliques possédant une chaîne latérale.

KAGANOVICH et coll. (13) séparent, par cristallisation fractionnée, divers acides gras (arachidique, béhénique, lignocérique, mélissique), tandis que BEL'KEVICH et coll. (14), 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. (15), par chromatographie sur alumine, montrent la présence d'hydrocarbures de haut poids moléculaire $(C_{15}H_{28})_n$ et d'un composé de formule brute $C_{15}H_{16}$.

On trouvera dans le tableau I la correspondance entre les noms usuels des principaux acides gras normaux et leurs noms

dans la nomenclature officielle.

ACIDE GRAS	NOM USUEL	NOMENCLATURE OFFICIELLE
C16	Palmitique	n-hexadécanoïque
C18	Stéarique	n-octadécanoïque
C20	Arachidique	n-eicosanoïque
C22	Béhénique	n-docosanoïque
C24	Lignocérique	n-tétracosanoïque
C26	Cérotique	n-hexacosanoïque
C27	Carbocérique	n-heptacosanoïque
C28	Montanique	n-octacosanoïque
C30	Mélissique	n-triacontanoïque

TABLEAU I : Noms usuels et officiels des acides gras saturés linéaires de C16 à C30.

THOMAS (16) chromatographie des bitumes présentant un maximum d'absorption en ultra-violet à 285 nm sur une résine échangeuse d'anions et étudie le spectre 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 (17, 18) 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 de C20 à C30. A l'aide de méthodes chromatographiques (chromatographie d'adsorption sur colonne d'alumine, couches minces, chromatographie en phase vapeur) et des méthodes conventionnelles de caractérisation chimique, il montre que la composition des résines 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 coll. se sont intéressés à plusieurs reprises aux acides contenus dans les cires de tourbe (19, 20, 21). A l'aide de la chromatographie sur colonne d'alumine et des méthodes chimiques conventionnelles, RAUHALA (22) suppose la présence d'acides gras hydroxylés dans les cires, responsables des réactions de polycondensation observées lorsqu'on chauffe les cires et les résines. SUNDGREN et coll. (21) peuvent mettre en évidence par CPV des acides gras saturés linéaires de C16 à C29, avec un maximum pour les acides en C24 et C26, sans parvenir à isoler et identifier d'acides hydroxylés.

MORRISSON et coll. (23, 24) 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 montrent dans la fraction saponifiable des cires la présence d'acides gras normaux de C18 à C34 (24% de la cire de tourbe et 30% de la cire du sol de jardin, avec un maximum pour les acides en C24, C26, C28, et C30). Dans la fraction insaponifiable ils identifient des alcools gras normaux de C16 à C30 , des alcanes non ramifiés de C16 à C33 avec des traces d'alcanes de C16 à C20. De la même manière ils identifient des méthyl-cétones de C17 à C35 (0,5% des cires de tourbe).

A partir d'une tourbe récente d'Israël, IKAN et coll. (3) séparent , par CPV, sous forme d'esters méthyliques, des acides gras normaux de C12 à C26 avec un maximum pour les acides en C16 et C18; 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.

Des résultats comparables sont obtenus par HEMMINGSON (25) en 1972 à partir d'une tourbe de l'île de Chatham (Nouvelle-Zélande). La composition des cires est analogue à celle des cires de lignite: présence de paraffines de C23 à C33 (prédominance des termes impairs), des alcools gras de C20 à C32 (prédominance des termes pairs).

En URSS les recherches sur les tourbes et sur les cires de tourbe en particulier ont donné lieu à un nombre important de publications.

IVANOVA et coll. en 1968 (26) séparent par CPV des acides gras normaux de C14 à C28 avec un maximum pour les acides en C22, C24 et C26.

BEL'KEVICH et coll. en 1971 (27) obtiennent après saponification 80% d' acides gras dont environ 24% sont des acides linéaires, avec prédominance des termes pairs de C18 à C26. Ils montrent par spectrométrie IR et RMN que la fraction des "résines" solubles dans l'acétone contient des acides analogues à ceux des cires et de masse molaire moyenne 400 (28).

Plus récemment (1982) ZHIL'TSOV (29) a mis en évidence par couplage CPV-spectrométrie de masse dans une tourbe de la région de Tomsk des éthers phénoliques, des acides gras de C16 à C30, des diacides gras de C15 à C22 et des acides monoinsaturés de C18 à C22, de l'acide hydroxy-12 dodécanoïque et des phtalates. En ce qui concerne ces derniers, nous pensons qu'il s'agit d'artéfacts, car les phtalates sont des contaminants courants des échantillons biologiques. Nous avons nous-mêmes trouvé des phtalates dans l'une de nos cires. Ils proviennent des matières plastiques couramment utilisées pour stocker les échantillons.

La fraction insaponifiable des cires a également retenu l'attention des chercheurs soviétiques. TSERLYUKEVICH et coll. en 1975 (30) séparent la fraction insaponifiable en cinq fractions par chromatographie sur alumine: ces fractions contiennent respectivement des hydrocarbures aliphatiques et cycliques, des alcools gras linéaires et ramifiés, des alcools cycliques, des composés inconnus possédant une fonction cétone. BEL'KEVICH et coll. en 1976 (31) mettent en évidence des alcools saturés essentiellement à nombre pair d'atomes de carbone. La présence d'alcools gras de C16 à C30 est à nouveau signalée en 1985 par KOLOSKOVA et coll. (32).

La Finlande possédant comme l'URSS d'importantes tourbières, les recherches consacrées à la tourbe y sont nombreuses.

EKMAN E. en 1977 (33) étudie la composition de diverses cires de tourbes finnoises en fonction de la principale espèce végétale qui intervient dans leur formation (exemples: *Sphagnum, Carex, Eriphorium*). Il compare ces cires avec celles obtenues directement à partir des plantes. Il met ainsi en évidence des

acides gras de C16 à C32, des alcools gras de C14 à C30 et des alcanes de C19 à C33. Les résultats obtenus avec les tourbes et les plantes sont semblables. Ceci démontre l'origine végétale des cires de tourbe. Les acides gras en C16, C18 et C20 prédominent dans les plantes tandis que les acides en C22, C24 et C26 prédominent dans les tourbes. Une explication possible de ce phénomène est peut-être la moindre résistance aux divers processus de dégradation des acides gras à chaîne relativement courte .

Les lipides extraits de tourbes se sont révélés être des mélanges extrêmement complexes. La séparation des différents constituants et leur identification ne sont pratiquement possibles qu'avec l'utilisation de colonnes capillaires en CPV couplée à la spectrométrie de masse.

C'est ainsi que EKMAN R. et coll. en 1981 (34) ont étudié une tourbe de Finlande prélevée à plusieurs profondeurs. Les principaux composés identifiés après hydrolyse alcaline des extraits de tourbe (sans fractionnement préalable de ces extraits) se répartissent entre les acides gras et les alcools gras, les ω-hydroxy-acides et des quantités plus faibles d'acides α-ω dicarboxyliques, d'hydrocarbures, de stérols et de triterpénoïdes. Les quantités de substances identifiables par CPV décroissent de 23 à 12 mg/g de tourbe sèche avec l'âge des échantillons prélevés entre 135 et 190 cm de profondeur. Elles restent à peu près constantes pour les échantillons prélevés à plus grandes profondeurs. Les divers extraits de tourbe contiennent une proportion importante de substances non identifiables par CPV, même après méthylation et silylation (46 à 48%). Nous avons nous-mêmes obtenu des résultats semblables avec nos divers échantillons.

Les chercheurs finnois ont également étudié la distribution des différents composés lipidiques de plusieurs extraits de tourbes fractionnés en "cires" et "résines" (35, 36). Les "cires" contiennent 80% de substances identifiables par CPV (essentiellement des substances à longue chaîne) et les "résines" seulement 28% (stérols, triterpénoïdes et acides à chaînes plus courtes).

III- LES HYDROXY-ACIDES.

Un important problème est celui de la recherche d'hydroxy-acides dans les cires de tourbes. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, les chercheurs ont observé après saponification des cires une réestérification dépendant du temps écoulé depuis la saponification et accélérée par chauffage (19). Les polyesters d'acides hydroxylés entrent dans la composition de la cutine et de la subérine. Ces deux substances désignent les cires qui constituent un film protecteur respectivement pour les parties aérienne (cuticule) et souterraine des plantes.

C'est ainsi qu'en 1959 VON RUDLOFF a mis en évidence des ω-hydroxy-acides de C12 à C18 dans la cire des feuilles de *Picea pungens* (37).

KOLATTUKUDY et coll. en 1972 (38) ont isolé l'acide 16-hydroxypalmitique et deux acides dihydroxylés en C16 à partir de la cuticule des feuilles de *Vicia faba* .

On a également trouvé des ω-hydroxy-acides de C20 à C30 dans des cires commerciales d'origine végétale (cire de Carnauba et cire d'Ouricuri) (39, 40).

On peut s'attendre à trouver ces hydroxy-acides dans les produits de dégradation de la cutine ou de la subérine après la mort des plantes. Des acides hydroxylés ont effectivement été identifiés par couplage CPV-SM dans un sédiment lacustre de 5000 ans d'âge par EGLINTON et coll. (41). Il s'agit d'acides gras hydroxylés en position ω de C16 à C26, ainsi que d'acides hydroxylés en position α ou β de C14 à C18.

BOON et coll. (1975) ont trouvé des acides hydroxylés en position α, β, ω et ω-1 dans un sédiment marin (42). Les acides hydroxylés en position α seraient d'origine animale. Les acides hydroxylés en β seraient dus à l'action de microorganismes. Il en serait de même pour les acides hydroxylés en ω -1 et ω. Les premiers n'existent pas dans le règne végétal et les auteurs pensent que la contribution de végétaux terrestres aux seconds est peu probable. Ils proviendraient également d'une activité microbienne.

Les travaux de POPL et coll. (1975) nous rapprochent davantage de la tourbe: ils ont trouvé des ω-hydroxy-acides de

C22 à C30 dans une cire de lignite(43).

Nous avons mis en évidence en 1977, pour la première fois dans une cire de tourbe, par CPV et spectrométrie de masse des ω-hydroxy-acides de C16 à C30, avec prédominance des acides en C22, C24, C26 (44). Ces résultats se confirment pour les autres échantillons que nous avons étudiés ultérieurement.Nous développerons ces différents points dans les prochains chapitres.

EKMAN R. et coll. (1981) obtiennent des résultats analogues à partir d'une tourbe de sphaignes de Finlande (45). EKMAN R. et coll. (1982) montrent qu'on obtient ces mêmes hydroxy-acides après hydrolyse alcaline des tissus sénescents de *Sphagnum fuscum* (46). Néanmoins la proportion de ces acides est plus importante dans la tourbe que dans les parties encore vertes des végétaux. Les auteurs suggèrent que l'accumulation des hydroxy-acides (et aussi des α-ω diacides saturés de mêmes longueurs de chaîne qui les accompagnent en plus faibles proportions) est un processus lié à l'âge de la tourbe. Ils confirment ces travaux en montrant que la proportion des hydroxy-acides obtenus après hydrolyse alcaline des tissus végétaux augmente avec la profondeur à laquelle les échantillons ont été prélevés. En revanche ils n'ont pas noté de variations significatives de la teneur en acides et alcools gras (47).

IV- STEROLS ET TRITERPENOIDES.

Par fractionnement chromatographique de la partie insaponifiable des cires extraites des mousses d'une tourbière canadienne, IVES et coll. (1958) isolent un mélange de β-sitostérol (Ia) et de β-sitostanol ou stigmastanol (IIa) et trois triterpénoïdes: α-amyrine (III), taraxérone (IV) et taraxérol (V) (48, 49).

A partir d'une tourbe écossaise, Mc LEAN et coll. (1958) obtiennent un mélange inséparable de β-sitostérol (Ia) et de β-sitostanol (IIa) et un triterpénoïde, l'épi-friedelanol (VI) (50).

En 1963 BEL'KEVICH et coll. (51) obtiennent, après fractionnement de la partie insaponifiable d'une cire de tourbe

sur colonne d'alumine, un composé possédant certaines propriétés du ß-sitostérol (formule Ia ci-dessous): il est identifié par le point de fusion de l'acétate et par son spectre IR.

IKAN et coll. (1963) mettent en évidence dans une tourbe d'Israël les composés suivants: friedeline (VII), épi-friedelanol (VI), ß-sitostérol et ß-sitostanol mélangés (52).

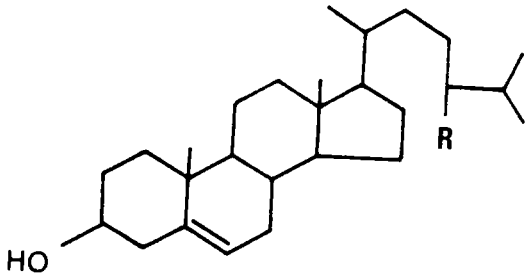
Le principal stérol isolé est donc le ß-sitostérol. Il represente 16,6% de la fraction d'une "résine" soluble dans le méthanol étudiée par KAGANOVICH et coll. (53).

Pour BEL'KEVICH et coll. (1977) la concentration en stérols semble décroître avec la profondeur de prélèvement des échantillons de tourbe (54). En 1982 ils comparent les extraits de tourbe et de lignite obtenus avec la ligroïne. Après chromatographie sur colonne ils trouvent que les extraits de tourbe et de lignite contiennent respectivement 5,9% et 0,7% de stéroïdes (55).

Les travaux les plus récents concernant les stérols et les triterpénoïdes mettent en oeuvre, comme pour la recherche des acides gras et des hydroxy-acides, la technique de couplage CPV capillaire-spectrométrie de masse. Les principaux stérols identifiés de cette manière par PIHLAJA et coll. (1981) sont le ß-sitostérol (Ia), le ß-sitostanol (IIa), le campestérol (Ib) et le campestanol (IIb) (56). L'échantillon étudié contient 1,4 mg de stérols pour 1g de tourbe sèche et le ß-sitostérol représente à lui seul la moitié des stérols isolés. La proportion de stérols est susceptible de variations en fonction de l'origine géographique des tourbes et de la profondeur, mais les auteurs n'ont pas trouvé de corrélation nette entre proportion et profondeur (57).

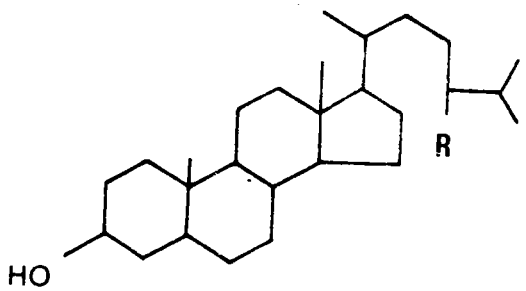
EKMAN R. et coll. (34) ont trouvé en plus de ces mêmes stérols deux alcools triterpéniques: le cycloarténol (VIII) et le méthylène-24 cycloartanol (IX).

Enfin TAYLOR et coll. ont caractérisé par RMN du proton des composés de la famille du hopane (Xa). Ces triterpénoïdes pentacycliques sont des composés universellement répandus dans les sédiments. Il s'agit du homo-30 hopane (C31) (Xb) et de l'acide hopanoïque en C32 (Xc) (58). QUIRK et coll. (1984) ont étudié la distribution de ces triterpénoïdes dans divers



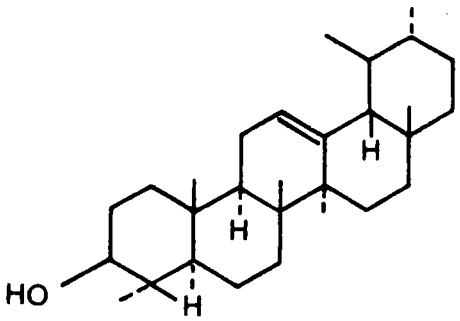
I a R = C_2H_5

I b R = CH_3

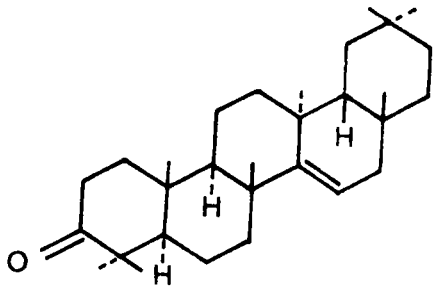


II a R = C_2H_5

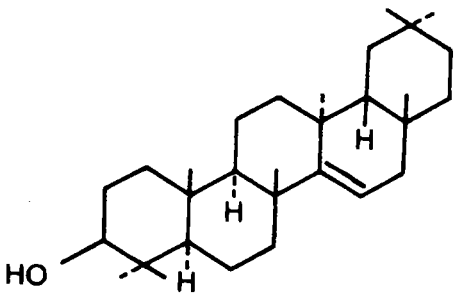
II b R = CH_3



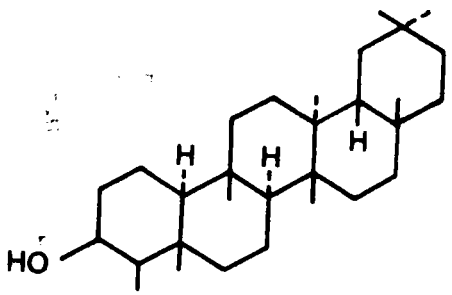
III



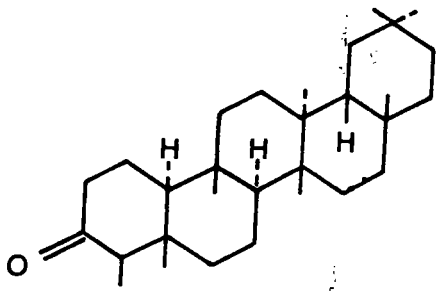
IV



V

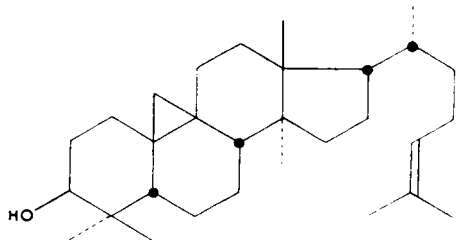


VI

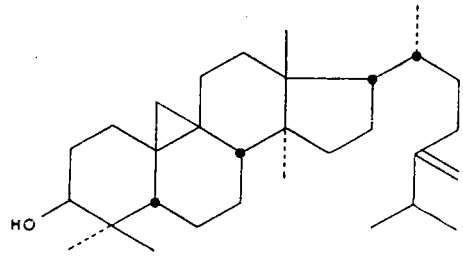


VII

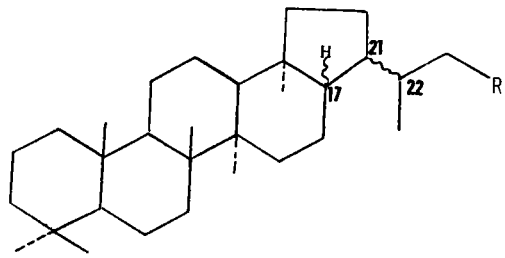
échantillons de tourbes d'Angleterre. La configuration stéréochimique du hopane en C31 (Xb), de l'acide en C32 (Xc) et de l'alcool en C32 (Xd) semble indicative d'une dégradation microbienne des plantes (59).



VIII



IX



Xa : R = H Xc : R = CH_2-COOH

Xb : R = CH_3 Xd : R = CH_2-CH_2OH

En résumé les auteurs ont essentiellement trouvé des acides gras et des alcools gras saturés linéaires de C16 à C32. Les termes à nombre pair d'atomes de carbone sont prépondérants, en particulier les termes en C22, C24 et C26. Ils sont essentiellement d'origine végétale. Les ω-hydroxy-acides de C16 à C30 et, en plus faibles proportions, les α-ωdiacides correspondants, constituent une famille importante de composés des cires. Ils proviennent probablement de la dégradation de la cutine et de la subérine des plantes. Leur abondance semble liée au degré de décomposition des végétaux.

Parmi les composés cycliques on trouve des stérols et de petites quantités de divers triterpénoïdes qui proviennent directement des végétaux ou ont pu subir des transformations à la suite d'une activité bactérienne.

Les substances identifiées ne représentent en moyenne que 50% environ de l'extrait de tourbe. Elles sont accompagnées de

composés inconnus non identifiables par CPV ou spectrométrie de masse.

AUTEURS (références)	ANNEE	ORIGINE DE LA TOURBE	PRINCIPALES SUBS-TANCES IDENTIFIEES
RYAN (5)	1909	IRLANDE	ACIDE C28H5602
SUNDGREN (21)	1965	FINLANDE	ACIDES GRAS C16-C29
IVANOVA (26)	1968	URSS	ACIDES GRAS C14-C28
IKAN (3)	1968	ISRAEL	ACIDES GRAS C12-C26
BEL'KEVICH (51)	1963	URSS	ß-SITOSTEROL
(27)	1971	URSS	ACIDES GRAS C18-C26
HEMMINGSON (25)	1972	NOUVELLE-ZELANDE	ACIDES GRAS C16-C32 ALCOOLS GRAS C20-C30 ALCANES C23-C33
TSERLYUKEVICH (30)	1975	URSS	ALCOOLS GRAS
EKMAN E (33)	1977	FINLANDE	ACIDES GRAS C16-C32 ALCOOLS GRAS C14-C30 ALCANES C19-C33
EKMAN R (34, 35)	1981	FINLANDE	ACIDES GRAS, ALCOOLS GRAS HYDROXY-ACIDES, STEROLS
PIHLAJA (56)	1981	FINLANDE	ß-SITOSTEROL ß-SITOSTANOL
QUIRK (59)	1984	ANGLETERRE	HOPANOIDES
WILHELM (60, 61) (44)	1973-74 1977	ALLEMAGNE	ACIDES GRAS, ALCOOLS GRAS HYDROXY-ACIDES

TABLEAU II : Résultats des principales recherches sur les cires de tourbes.

Nous avons nous-mêmes apporté notre contribution à l'étude de cires de tourbes provenant d'Allemagne et de France: identification d'acides gras de C16 à C34, de diacides carboxyliques (60, 61); tentatives de caractérisation des produits lourds par voie chimique et par chromatographie

d'exclusion (62); mise en évidence pour la première fois dans une cire de tourbe d'acides ω-hydroxylés de C16 à C30 (44); identification de stérols et de triterpénoïdes.

Les principaux travaux et résultats obtenus par les différents auteurs sont résumés par le tableau II et la figure 2.

Nous allons exposer dans ce mémoire nos travaux se rapportant à divers extraits de tourbe ("Floratorf", tourbière de Vitrimont) et un sol hydromorphe (anmoor de Lachaussée).

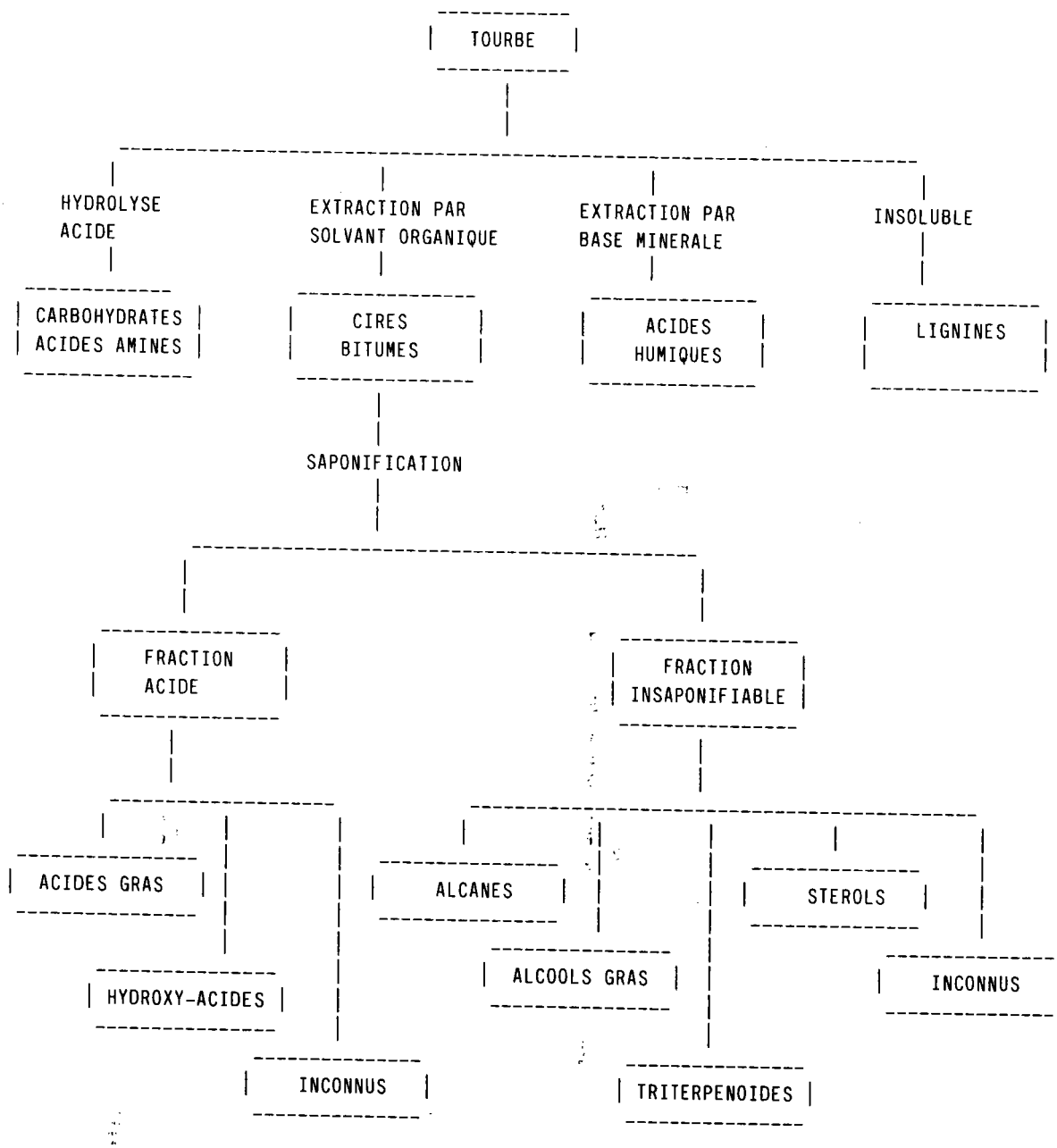


Fig 2: Composition chimique typique d'une tourbe.

CHAPITRE II

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE GLOBALE DES CIRES

I- ORIGINE DES ECHANTILLONS. NOMENCLATURE.

Nous avons étudié parallèlement les cires extraites des divers échantillons suivants:

- tourbe " Floratorf", provenant d'Oldenburg en RFA (horizon A0);
- tourbe provenant de la forêt de Vitrimont (Meurthe-et-Moselle) prélevée à deux profondeurs: 0-10 cm et 80 cm;
- un humus hydromorphe: anmoor de l'étang de Lachaussée (Meuse) prélevé également à deux profondeurs, 0-10 cm et 10-20 cm.

Les échantillons de tourbes présentent un pH nettement acide voisin de 4, tandis que l'anmoor est neutre (pH = 7).

Nous utiliserons la nomenclature suivante pour désigner les divers échantillons:

Floratorf	Vitrimont		Lachaussée	
	0-10 cm	80 cm	0-10 cm	10-20 cm
F	V0	V1	L0	L1

Cette nomenclature est complétée par les lettres b, a, i, ou r.

b	cire brute
a	fraction acide après saponification
i	fraction insaponifiable
r	cire réduite par $LiAlH_4$ ou un réducteur équivalent

Exemple: V1a désigne la fraction acide des cires de la tourbe de Vitrimont prélevée à 80 cm de profondeur.

II- EXTRACTION.

Avant extraction, les divers échantillons sont séchés à l'étuve à 40 °C jusqu'à poids constant, puis triturés dans un mortier afin de désagréger les agglomérats qui ont pu se former au cours du séchage.

L'extraction des cires est effectuée à l'éther éthylique dans un extracteur de Soxhlet. On arrête l'extraction lorsque la phase éthérée reste incolore dans le siphon de l'extracteur. Nous avons vérifié qu'après renouvellement du solvant, il n'y a plus de substances extractibles par un nouveau traitement à l'éther.

Les cires de tourbes obtenues après élimination du solvant se présentent sous forme de pâtes de couleur jaune à brun qui s'accentue par chauffage dès 60 °C. Les cires extraites de l'anmoor présentent une coloration brun foncé mélangée à une teinte verdâtre.

Ces cires se redissolvent assez facilement dans le chloroforme, le benzène, la pyridine et le tétrahydrofuranne, plus difficilement dans l'éther éthylique, partiellement dans le méthanol ou l'éthanol bouillants. Leur solubilité est faible même à chaud dans les alcanes légers, le sulfure de carbone ou le tétrachlorure de carbone.

Le tableau III résume les rendements des cires brutes en mg pour 100 g de matière première sèche.

III- 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'hydrolysat 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 la fraction insaponifiable avec trois portions de 100 ml d'éther éthylique, en prenant soin de laisser l'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 Na_2SO_4 anhydre, puis évaporation du solvant, on obtient la

fraction 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. Après séchage sur Na_2SO_4 anhydre et élimination de l'éther, on obtient la fraction acide des cires.

On trouvera dans le tableau III les rendements des diverses fractions exprimées en % de l'extrait brut. Les pertes, qui varient suivant les manipulations de 3% à 22% de la cire brute, proviennent sans doute de composés non extraits par l'éther et restant en solution ou en suspension dans la phase hydro-alcoolique.

La masse molaire moyenne (voir ci-dessous) de la fraction acide Fa 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 (63), est de l'ordre de 1,4 milli-équivalent (méquiv.) pour 1 g de cire F. Les dosages effectués en présence de phénol-phtaléine ou par potentiométrie sont peu précis car les virages sont très difficiles à apprécier.

ECHANTILLON	CIRE BRUTE mg / 100 g	FRACTION ACIDE % extrait brut	INSAPONIFIABLE % extrait brut	PERTES % extrait brut
F	2500	65	20	15
V0	400	34	44	22
V1	320	62	35	3
L0	170	18	66	16
L1	160	54	35	11

TABLEAU III: Rendements en cire brute, fraction acide et fraction insaponifiable.

IV- CARACTERISTIQUES CHIMIQUES.

Nous avons effectué les diverses analyses lorque nous avons commencé l'étude des cires F. Comme elles ne nous

apportent que peu de renseignements, nous ne les avons pas renouvelées systématiquement pour les cires V et L.

IV-1 Composition.

Les résultats des analyses de divers échantillons sont donnés dans le tableau IV. Les teneurs en oxygène sont obtenues par différence. Le pourcentage d'azote est dans tous les cas inférieur à 1,5%. Le taux de cendres de nos échantillons , dans lesquels nous n'avons décelé 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. La comparaison des taux de carbone et d'hydrogène retrouvés par calcul à partir des fractions acides et insaponifiables avec les taux correspondants des cires brutes montrent que les mesures sont correctes, sauf pour l'échantillon V1.

IV-2 Masse molaire.

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

Pour vérifier la validité des mesures, nous avons determiné 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 hydrogènes 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.

La dispersion des différentes valeurs obtenues pour un même échantillon est largement supérieure aux incertitudes expérimentales. Dans certains cas on obtient des résultats plutôt surprenants, comme par exemple pour l'échantillon V1: la masse molaire de la fraction acide est supérieure à celle de la

cire non saponifiée. Ceci montre que les diverses fractions sont susceptibles d'évoluer après saponification par l'intermédiaire de réactions de polyestérification ou d'autres réactions de polymérisation.

CIRE	C	H	N	O	MASSE MOLAIRE
Fb	76,94	11,55	traces	11,51	1110
	75,18	11,67	traces	13,15	1060
	75,44	10,58	traces	13,98	915
					1030
					1065
Moyenne	75,8	11,3	traces	12,9	1035
Retrouvé	75,9	11,1		13,0	
Fa	74,55	11,06	traces	14,39	634
	75,20	11,04	traces	13,76	643
					615
					727
					695
					800
Moyenne	74,9	11,05	traces	14,05	685
Fi	78,74	11,50	traces	9,76	472
	79,69	11,27	traces	9,04	480
					500
Moyenne	79,2	11,4	traces	9,4	485
V0a	70,85	10,4	0,15	18,6	795
V0i	78,0	11,8		10,2	502
V1b	79,2	11,8		9,0	710
Retrouvé	73,7	10,9			
V1a	73,5	10,7		15,8	880
V1i	74,1	11,3	0,15	14,5	520
L0a	68,7	9,0	1,4	20,9	
L0i	76,2	11,6	0,2	12,0	650
L1b	76,4	12,1		11,5	690
Retrouvé	76,4	12,5		11,1	
L1a	75,9	12,3	0,3	11,5	730
L1i	77,1	12,8	0,4	10,7	560

TABLEAU IV: Compositions centésimales et masses molaires.

IV-3 Indice d'iode.

Il est déterminé selon la méthode de HANUS (63). 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 à la masse d'iode, en grammes, fixée par 100g de substance (voir annexe I page 168).

Les résultats de plusieurs dosages donnent des indices compris entre 43,1 et 63,5 pour la cire brute Fb, entre 40,6 et 73,6 pour la fraction acide Fa, ce qui correspond à 1,6 à 2,9 doubles liaisons pour 1000g. A titre de comparaison l'indice d'iode du beurre est de 34-45, celui de l'huile de palme de 45-58 et celui de l'huile de maïs de 110-128.

La dispersion de nos résultats montre une fois encore la difficulté d'obtenir des échantillons de compositions identiques. 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 des cires.

IV-4 Indice de méthoxyle.

Le dosage des groupements O-CH3 (éthers et esters méthyliques) est effectué à l'aide de la méthode de ZEISEL (63) (voir annexe II page 168).

L'indice de méthoxyle de l'échantillon Fa, nul avant méthylation (voir annexe III page 169), est voisin de 2,2 méquiv de groupement méthoxyle pour 1g de cire.

IV-5 Acidité.

Les dosages sont effectués en milieu non aqueux, dans un mélange benzène-méthanol (4-1 v/v) proposé par LUGOWSKA et coll. (64). 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 (voir fig.3). Les résultats de plusieurs dosages donnent une acidité moyenne de 1,0 ± 0,1 méquiv/g pour la cire brute Fb et de 2,1 ± 0,1 méquiv/g pour la

fraction acide Fa. Cette dernière valeur est en accord avec les résultats des dosages des groupements méthoxyles.

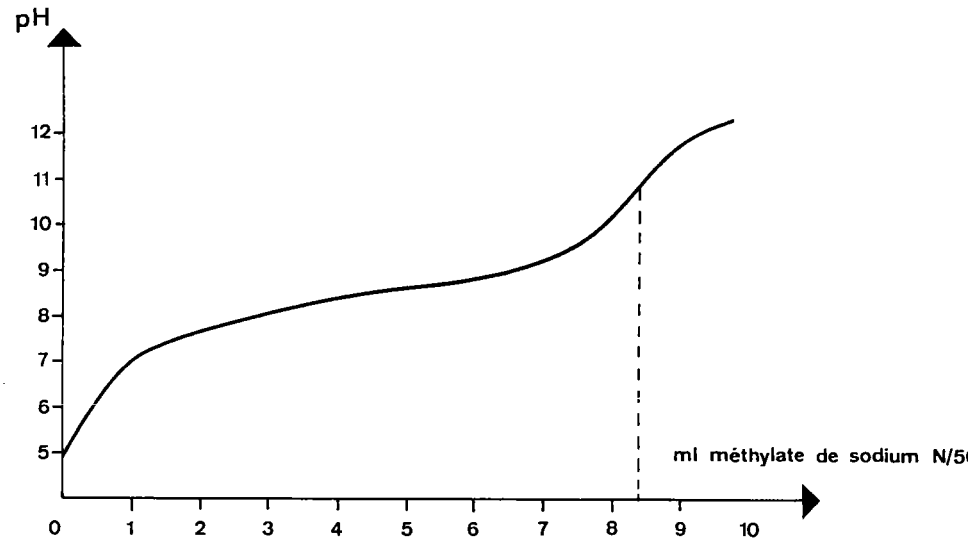


Fig.3: Exemple de dosage potentiométrique de l'échantillon Fa par le méthylate de sodium N/50.

IV-6 Fonctions hydroxyles et carbonyles.

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 (63).

La détermination des fonctions C=O est basée sur la réaction de l'hydroxylamine avec les composés cétoniques (63) (voir annexes IV et V page 170).

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

Toutes les déterminations précédentes, que nous avons réalisées pour notre thèse de 3ème cycle, sont souvent peu précises et peu reproductibles, à cause du manque d'homogénéité des divers échantillons et de la difficulté à dissoudre les cires dans la plupart des réactifs. Elles sont surtout utiles à l'étude des corps gras et des produits chimiques purifiés et ne présentent dans notre cas qu'un intérêt qualitatif.

IV-7 Réactions qualitatives des stérols.

Les fractions insaponifiables des diverses cires se présentent sous forme de pâtes jaunes moins colorées que les cires brutes ou acides. La fraction insaponifiable Fi donne quelques réactions qualitatives positives des stérols et des alcools triterpéniques.

IV-7-1 Réaction de SALKOWSKI.

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

IV-7-2 Réaction de LIEBERMANN-BURCHARD.

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

IV-7-3 Réaction de ZAK.

En présence de quelques ml de chlorure ferrique à 1g/litre dans l'acide sulfurique concentré et de quelques ml d'acide acétique indifférent à l'anhydride chromique, la fraction insaponifiable développe une coloration rouge-brun.
Le dosage colorimétrique suivant cette réaction (65) ne peut être interprété convenablement sans connaître la nature exacte des composés responsables de la coloration.

IV-8 Recherche de polyols.

Nous nous sommes demandés si la saponification ou l'hydrolyse acide par l'acide sulfurique N de la cire brute Fb libérait des glucides ou des polyols (glycérol par exemple). En

effet la tourbe contient des carbohydrates et des acides aminés: nos cires pourraient donc contenir des esters de glucides. Après hydrolyse acide par l'acide sulfurique N ou l'acide chlorhydrique N, la phase aqueuse est extraite à l'éther, puis concentrée pour être étudiée par chromatographie sur papier. En utilisant comme éluant le mélange pyridine-benzène-butanol-eau-acide acétique (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 des sucres par le ferricyanure de potassium (66), 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 determinées sont donc trop faibles pour provenir de l'hydrolyse de glycolipides. Il s'agit probablement de sucres entrainés au cours de l'extraction des cires.

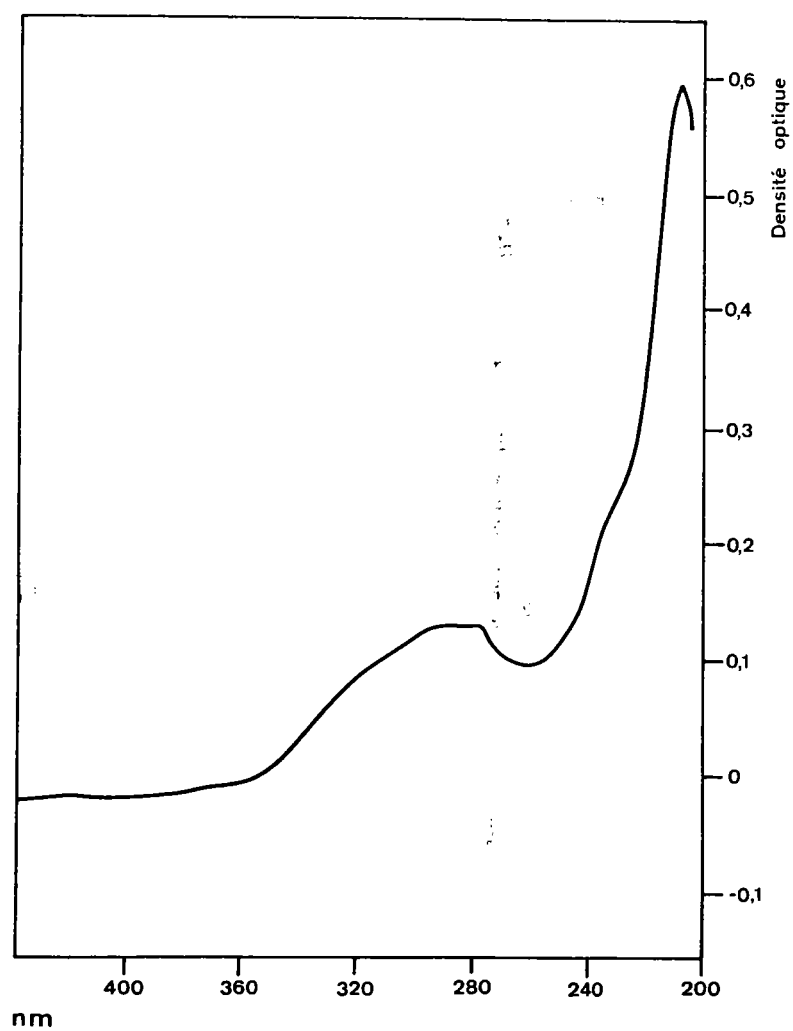


Fig.4: Spectre UV de la cire brute Fb (solvant: n-hexane).

V- ETUDE SPECTROSCOPIQUE.

V-1 Spectres UV.

Le spectre ultra-violet des cires F, enregistré sur un spectrophotomètre "Bausch et Lomb Spectronic 505", est pauvre en dépit de leur coloration. Examinée dans le n-hexane, la fraction soluble des cires présente une absorption faible entre 270 et 330 nm (fig. 4).

V-2 Spectres IR.

Les échantillons sont examinés sous forme de pastilles de KBr et les spectres sont enregistrés sur un spectrographe "IR 457 Perkin-Elmer". Ces pastilles sont obtenues en comprimant sous une pression de 8 tonnes/cm^2 un mélange de 3 mg de cire et de 300 mg de KBr homogénéisé par trituration avec 1 ml de chloroforme.

V-2-1 Cire brute Fb et fraction acide Fa.

Le spectre IR de la cire brute (fig. 5a) présente les caractéristiques suivantes:

- bande très large à 3420 cm^{-1}: fonctions OH liées par liaison hydrogène;
- bandes intenses à 2960, 2920 et 2850 cm^{-1} dues aux groupements CH_2 et CH_3;
- bande à 1740 cm^{-1} provenant du carboxyle d'esters aliphatiques;
- bande à 1710 cm^{-1}: carbonyle de fonction COOH;
- bande faible et large vers 1640 cm^{-1} provenant peut-être de doubles liaisons éthyléniques;
- 1460 et 1375 cm^{-1} : bandes dues aux vibrations de déformation des groupements CH_2 et $C-CH_3$;
- bande large à 1260 cm^{-1} que nous attribuons aux liaisons C-O et au mode de déformation des groupements OH;
- 720 cm^{-1}: il s'agit d'une bande caractéristique d'un enchaînement $(CH_2)_n$ avec $n > 4$.

Le spectre IR de la fraction acide (fig. 5b) présente les mêmes caractéristiques, à l'exception de la bande ester à 1740 cm^{-1}.

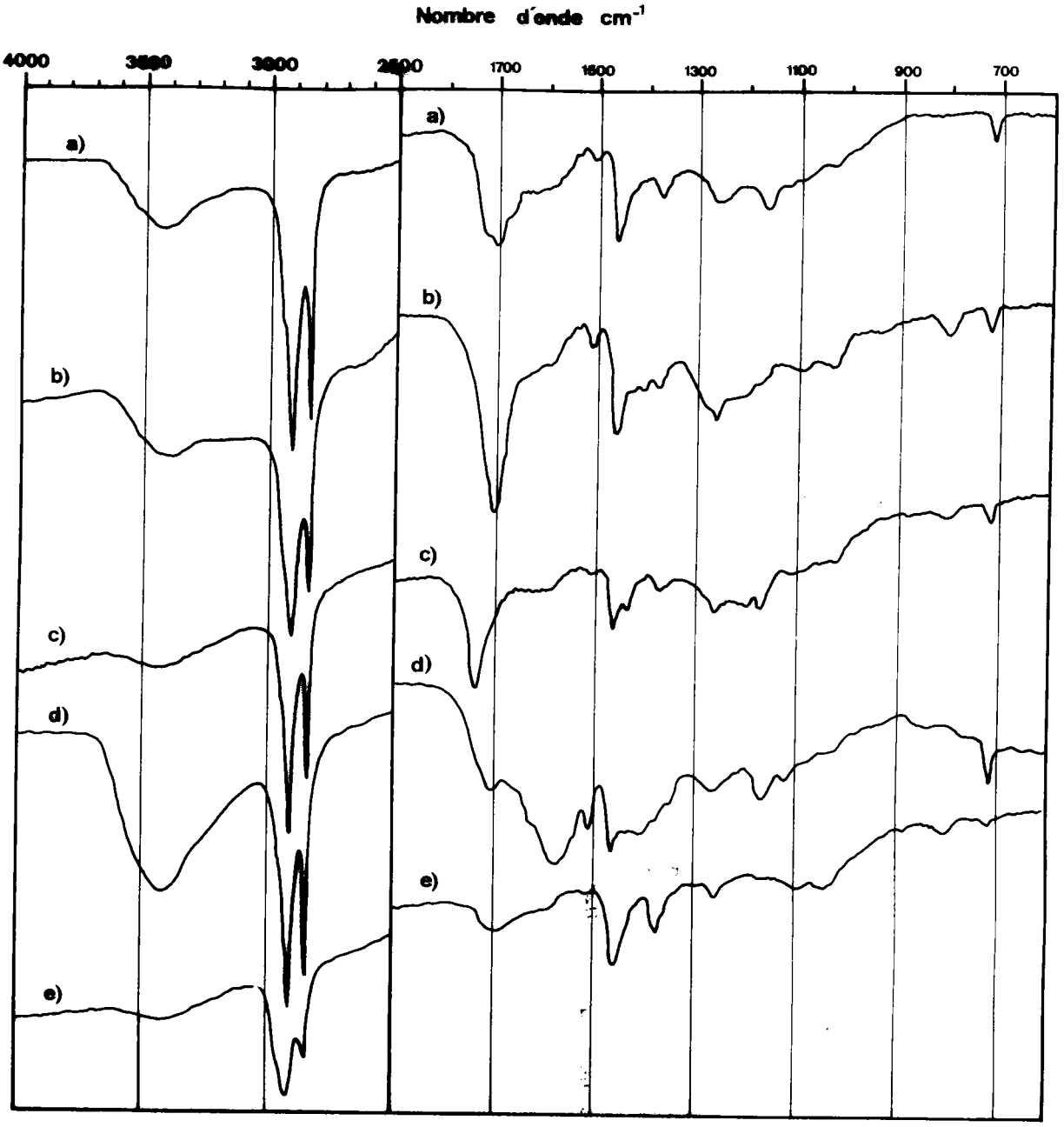


Fig. 5: Spectres IR des cires. a: cire brute Fb; b: fraction acide Fa; c: fraction Fa méthylée; d: fraction Fa, sel de Ba; e: fraction insaponifiable Fi.

V-2-2 Cire Fa méthylée.

La méthylation préalable de la fraction acide conduit au déplacement de la bande à 1710 cm^{-1} vers 1740 cm^{-1} (transformation d'un carboxyle en ester aliphatique) et à l'apparition de bandes caractéristiques d'esters à 1260, 1200

et 1170 cm^{-1}. Une absorption persiste à 3420 cm^{-1} (fig. 5c), indiquant peut-être une méthylation incomplète ou la présence de fonctions OH.

V-2-3 Spectre IR des sels de baryum.

Nous avons determiné le spectre IR des sels de baryum (voir préparation annexe VI page 171) afin de vérifier l'existence de fonctions carboxyliques. Le spectre obtenu (fig. 5d) montre la disparition presque complète de la bande à 1710 cm^{-1} et l'apparition d'une bande large à 1580 cm^{-1} attribuée à l'ion $R-COO^-$.

L'examen de ces spectres suggère que la fraction 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.

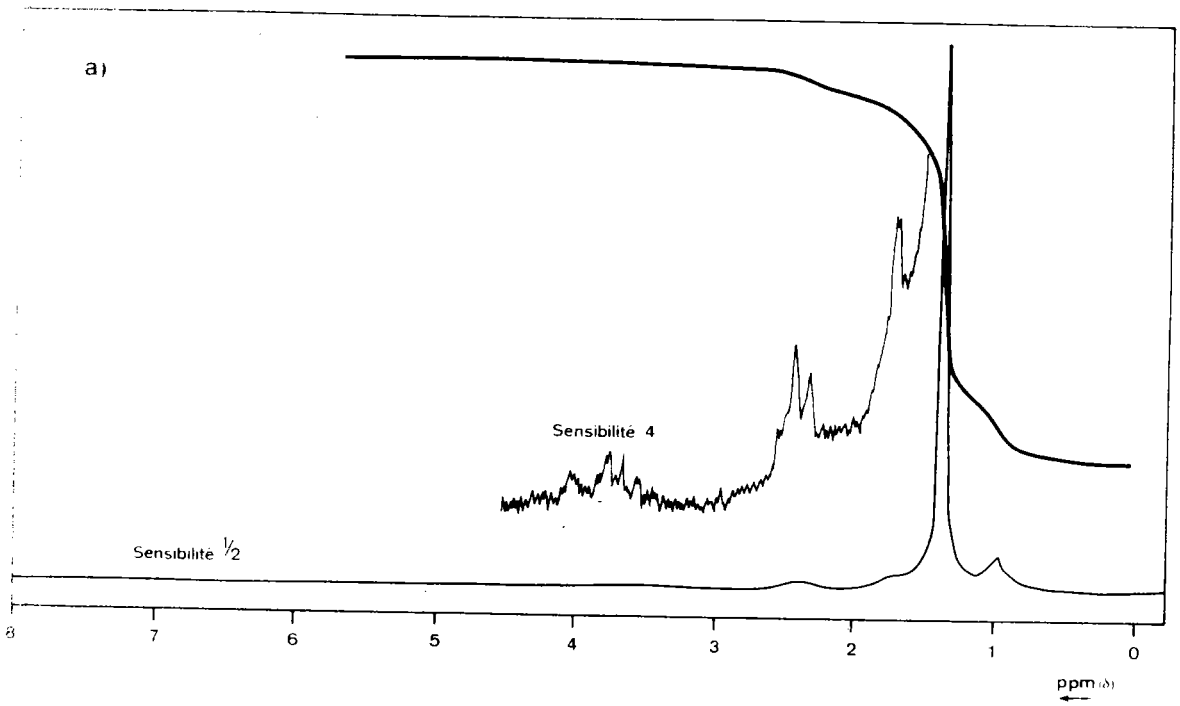
V-2-4 Spectre IR de la fraction insaponifiable.

A part la quasi-absence d'absorption dans la région 1700-1750 cm^{-1}, le spectre IR de la fraction insaponifiable (fig. 5e), présente la même allure que les spectres précédents. Le mélange doit être constitué 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.

V-3 Résonance magnétique nucléaire (RMN).

V-3-1 RMN ^1H.

Les déplacements chimiques exprimés en ppm sont mesurés par rapport au tétraméthylsilane pris comme référence. Les spectres RMN (60 MHz) ont été enregistrés sur un appareil "Perkin-Elmer R 12". Les spectres de la fraction acide Fa ou de la fraction insaponifiable Fi (fig. 6a et 6b) confirment la structure $-(CH_2)_n - CH_3$ (pic intense à 1,25 ppm et massif à 0,85 ppm). Le groupement $-CH_2COO-$ est responsable du massif



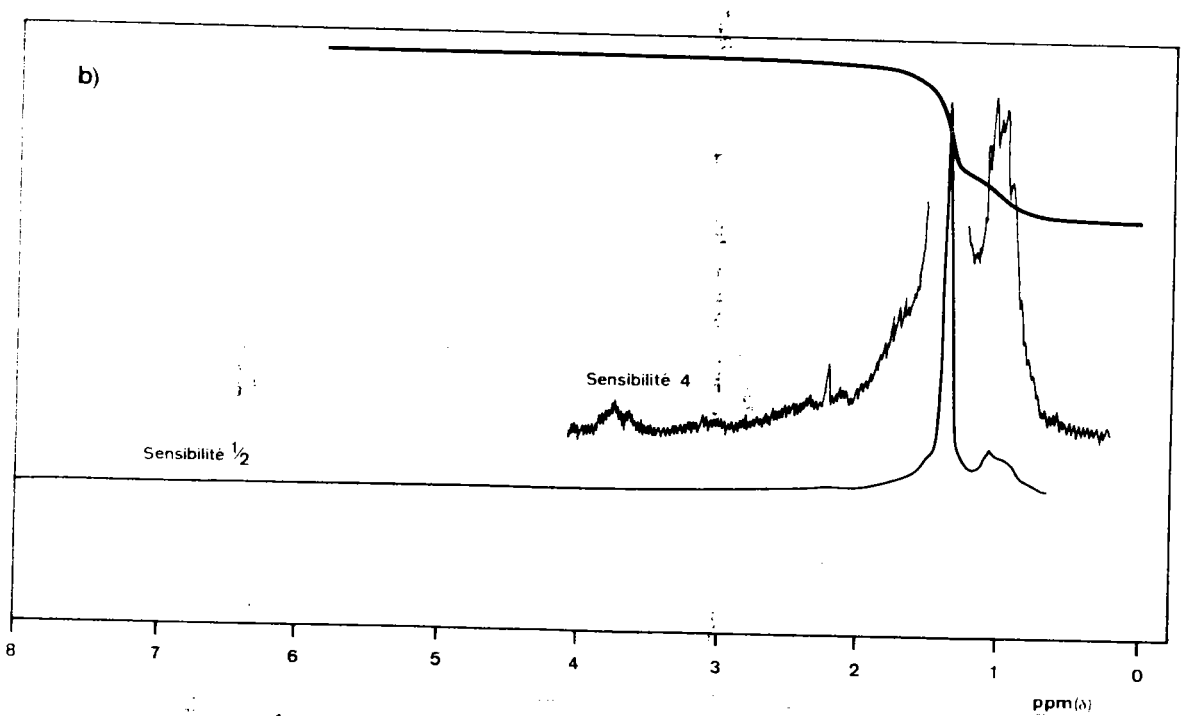
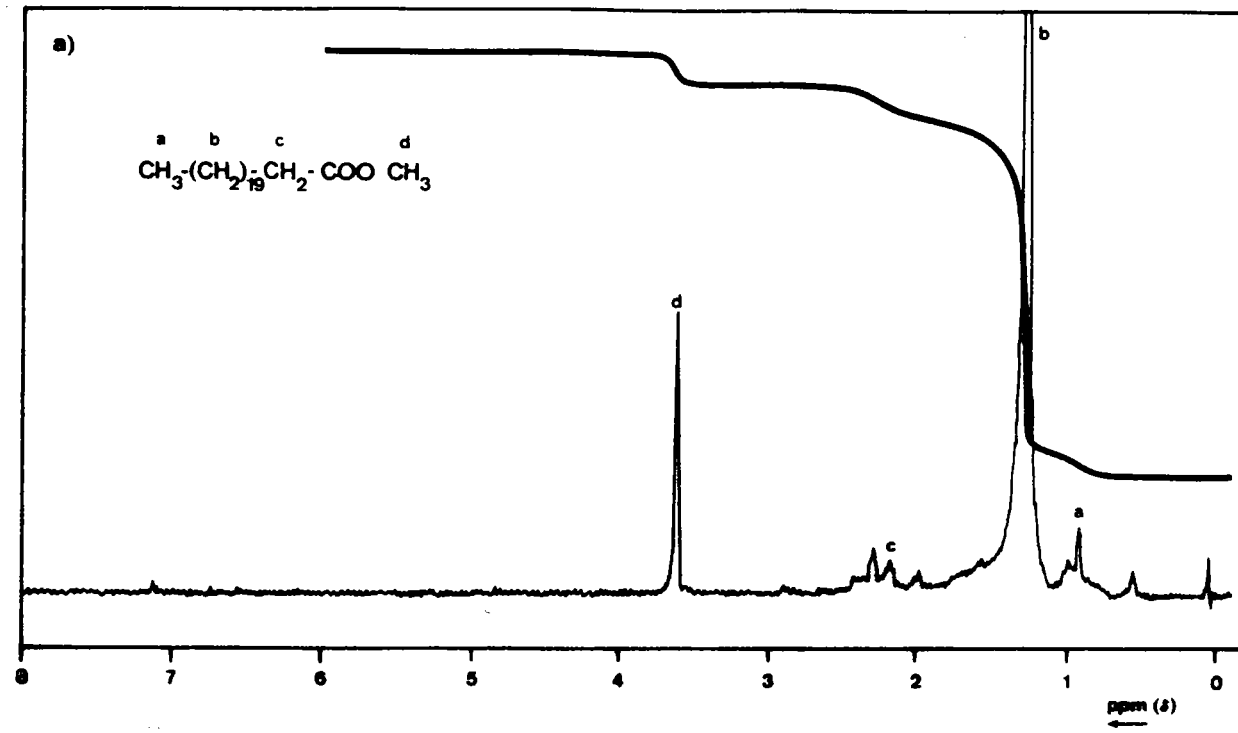


Fig. 6: Spectres RMN ^{1}H. a: fraction acide Fa; b: fraction insaponifiable Fi.



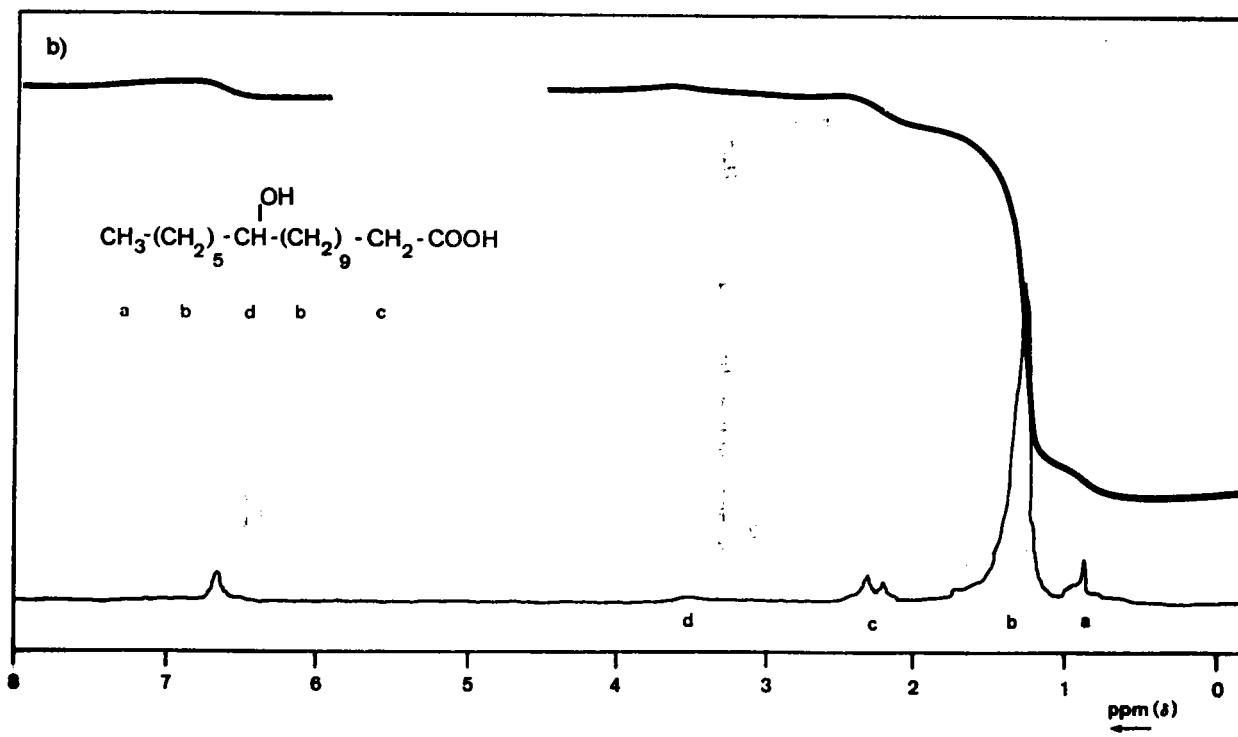


Fig. 7: Spectres RMN ^{1}H. a: docosanoate de méthyle; b: acide 12-hydroxy-stéarique.

observé vers 2,3 ppm dans le spectre de la fraction Fa (fig. 6a), du docosanoate de méthyle (fig. 7a) et de l'acide hydroxy--12 stéarique (fig. 7b). Le massif à 3,7 ppm (fig. 6a et 6b) peut être attribué aux atomes d'hydrogène d'un carbone porteur d'une fonction alcool primaire ou secondaire (cf fig. 7b).

V-3-2 RMN ^{13}C.

Nous avons également enregistré le spectre RMN ^{13}C de quelques échantillons en solution dans $CDCl_3$. Les spectres ont été obtenus à l'aide d'un appareil BRUCKER WP SY ^{13}C 20,15 MHz à transformée de Fourier couplé à un ordinateur permettant l'acquisition de données et leur traitement. Les protons sont entièrement découplés, ce qui permet l'observation de singulets pour chaque type de carbone. Par ailleurs, l'utilisation de la technique de SEFT (Spin Echo Fourier Transform) permet d'inverser les signaux dus aux atomes de carbone porteurs d'un nombre impair d'atomes d'hydrogène (CH_3, CH), ceci par rapport au signal de référence du $CDCl_3$. La constante de couplage entre C et H choisie est J = 125 Hz. La figure 8 montre le spectre obtenu avec 200 mg de la fraction acide V1a (tourbe de Vitrimont, 80 cm) pour 1600 accumulations. On observe principalement un pic à 29,2 ppm et un petit pic à 178,8 ppm. On retrouve ces pics dans le spectre de l'acide stéarique à 29,3 ppm et 179,6 ppm. Ces pics correspondent respectivement aux groupements $(CH_2)_n$ et COO. Ces signaux ne sont pas inversés par la SEFT.

La méthode n'est pas applicable à la détection de doubles liaisons éthyléniques dans un mélange complexe. Nous avons comparé les spectres de divers mélanges d'acide stéarique et d'oléate de méthyle $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7-COOCH_3$ en proportions variables. Avec l'oléate de méthyle pur (3,37 doubles liaisons pour 1000 g), les carbones de la double liaison donnent deux signaux très voisins à 129,3 ppm et 129,5 ppm qui s'inversent lorqu'on utilise la séquence SEFT. Ces signaux ne sont pas visibles dans un mélange à 20% d'oléate de méthyle (0,67 double liaison pour 1000 g).

En pratique, seuls sont visibles les C-H aliphatiques et le carboxyle (acide ou ester), même pour un grand nombre

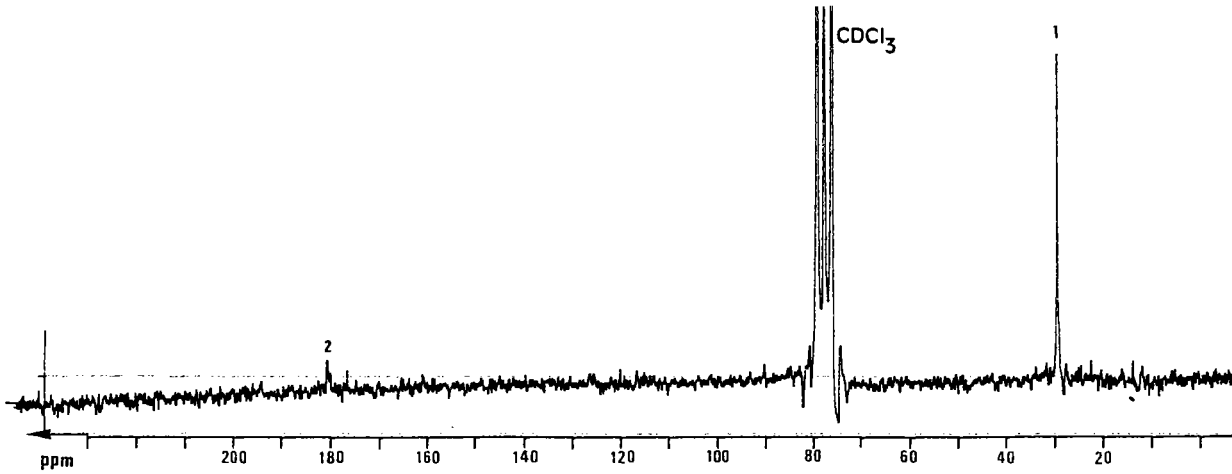


Fig. 8: Spectre RMN ^{13}C de l'échantillon VIa; SEFT: D1 = 10 s, D2 = 0,008 s; 1600 accumulations. Pics (ppm): 1 (29,2): $(CH_2)_n$; 2 (178,8): COO.

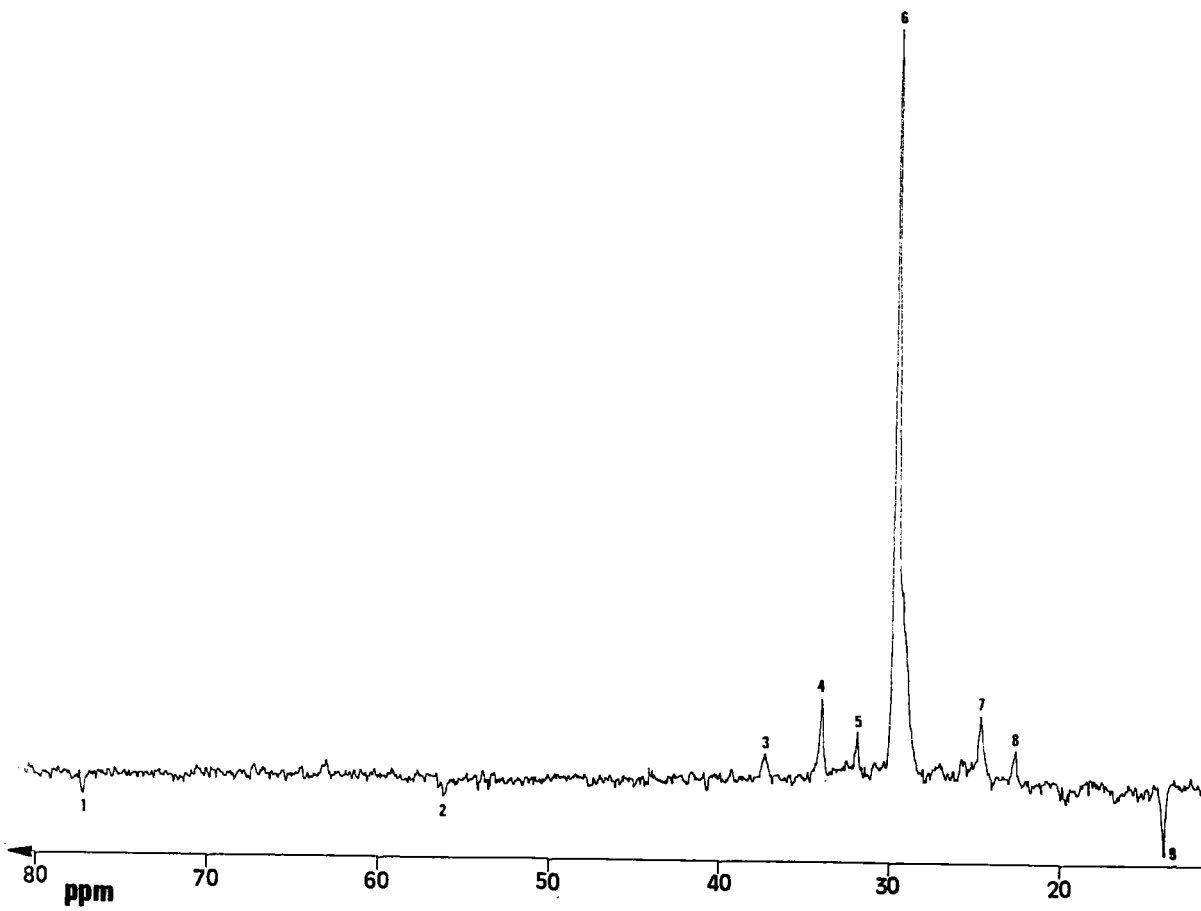


Fig. 9: Spectre RMN ^{13}C de la cire brute Fb: DEPT $\theta = 3\pi/4$; D1 = 10s, D2 = 0,008s; 9800 accumulations. Pics (ppm): 1 (77,3): CH; 2 (56,1): CH; 3 (37,2): CH_2; 4 (33,9): CH_2; 5 (31,8): CH_2; 6 (29,6): CH_2; 7 (24,6): CH_2; 8 (22,5): CH_2; 9 (13,9): CH_3.

d'accumulations. A titre d'exemple la figure 9 donne le spectre de la cire Fb pour 9800 accumulations dans la région 0-80 ppm. Les attributions pour les divers pics sont indiquées dans la légende de la figure.

VI- CONCLUSION.

En conclusion de ce chapitre, les méthodes classiques d'analyse des lipides ou l'analyse spectroscopique globale des cires, avant ou après saponification, ne nous fournissent que peu de renseignements. Les cires sont essentiellement des composés à longue chaîne aliphatique peu ramifiée et comportant des groupements carboxyles et hydroxyles. La détection de structures cycliques (stérols, triterpénoïdes) n'est pas possible par ces méthodes. De même, malgré un indice d'iode non négligeable, il semble qu'il y ait peu de doubles liaisons éthyléniques. Dans la limite de la précision de la RMN ^{1}H, il semble également qu'il n'y ait pas de structures aromatiques.

C H A P I T R E III

CHAPITRE III

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

I- PREFRACTIONNEMENT DES CIRES.

I-1 Intérêt d'un préfractionnement.

L'analyse des différents échantillons après saponification peut être effectuée directement par CPV, après conversion en dérivés adéquats. Dans certains cas le chromatogramme obtenu est extrêmement complexe et il peut y avoir élution simultanée ou chevauchement partiel de plusieurs composés, ce qui est gênant pour l'analyse qualitative et quantitative. On a donc intérêt à réaliser un préfractionnement des cires permettant d'obtenir à partir des différentes fractions des chromatogrammes plus simples, donc plus faciles à exploiter.

I-2 Chromatographie d'adsorption.

I-2-1 Chromatographie sur gel de silice.

Nous avons initialement effectué le préfractionnement sur environ 500 mg de cire Fa méthylée dissoute dans 5 ml de benzène sur une colonne de 2,5 cm de diamètre, contenant 100 g de "Kiesegel Merck", de granulométrie 0,05 mm-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 le benzène et filtrés sur "Millipore" de diamètre 25 mμ , afin d'éliminer les très fines particules de gel de silice qui sont entraînées au cours de l'élution.

Le tableau V donne les rendements des différents éluats, leurs masses molaires moyennes en nombre déterminées par tonométrie et leur composition centésimale. La figure 10 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. Les taux de carbone et d'hydrogène retrouvés par calcul sont légèrement inférieurs aux taux initiaux.

La polarité croissante des éluants fournit des fractions de plus en plus polaires, et l'on trouve dans la fraction A les composés les moins polaires, c'est-à-dire des esters méthyliques d'acides gras, comme le montre l'analyse par CPV. La masse molaire moyenne (420), qui correspond à une longueur de chaîne moyenne de 26 à 27 atomes de carbone, ainsi que le

FRACTION	RENDEMENT %	COMPOSITION %, O 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	
Initial Retrouvé		74,9 72,65	11,05 10,85		14,05 16,5	
TOTAL	99,2					

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

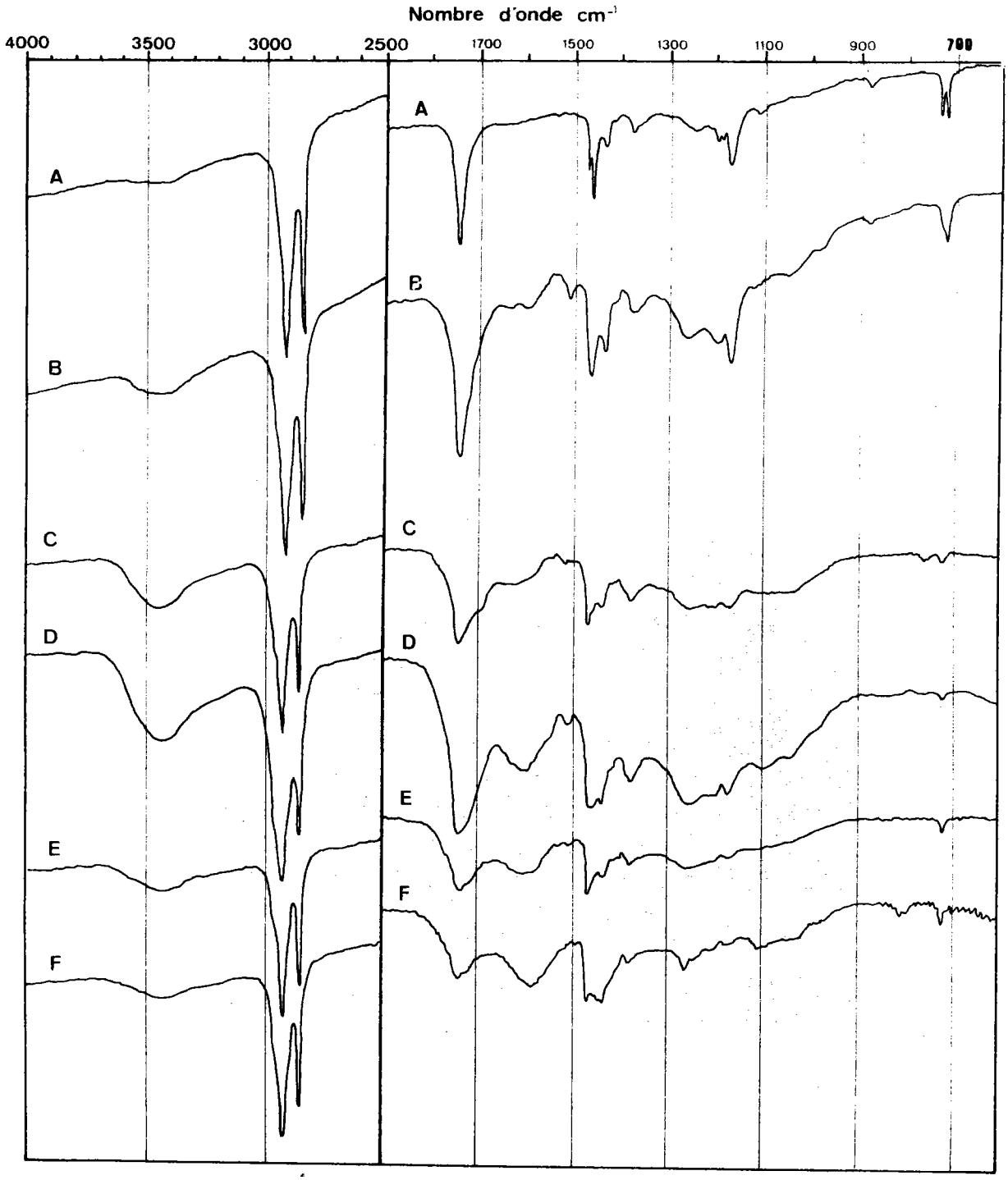


Fig. 10: Spectres IR des différents éluats obtenus par chromatographie sur gel de silice de la cire Fa méthylée.

rapport carbone/hydrogène (6,2 contre 6 pour un ester méthylique d'acide gras saturé) sont en accord avec ces prévisions.

La fraction B (pratiquement 45% de la fraction acide) contient peu de substances volatiles en CPV. Son spectre IR diffère très peu de celui de la fraction A, si ce n'est l'absorption à 3450 cm^{-1} (fig. 10) attribuable à des groupements hydroxyles. De même la masse molaire est à peine plus élevée. La composition centésimale de la fraction B est voisine de la composition d'une molécule moyenne contenant 25 atomes de carbone, 4 atomes d'oxygène (dont le groupement $-COOCH_3$) et deux sites d'insaturation supplémentaires soit $C_{23}H_{43}O_2-COOCH_3$.

Après silylation des fonctions OH nous avons pu mettre en évidence dans cette fraction des acides gras ω-hydroxylés.

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 cm^{-1} (fig. 10). Ces fractions ne contiennent pas de substances analysables par CPV.

Cette méthode de préfractionnement consomme beaucoup de solvants et n'est pas très satisfaisante lorsqu'on ne dispose que de petites quantités d'échantillons.

I-2-2 Chromatographie sur alumine.

Nous avons finalement adopté la procédure suivante adaptée à la séparation d'environ 15 à 20 mg de cire, aussi bien pour la fraction acide méthylée que pour la fraction insaponifiable. Ce préfractionnement permet de séparer les constituants des cires en grandes familles de composés (voir ci-dessous). L'échantillon (15-20 mg) dissous dans 1 ml de benzène est appliqué sur une colonne de 8 mm de diamètre contenant 2 g d'alumine standard "Merck".

L'insaponifiable est séparé en six fractions:

- 4 ml de benzène: fraction I (hydrocarbures aliphatiques, hydrocarbures et cétones triterpéniques;
- 6 ml de benzène: fraction II (alcools gras, alcools triterpéniques);
- 10 ml de benzène: fraction III (stérols);

- 4ml de chloroforme: fraction IV (queue de fraction III);
- 8 ml de chloroforme: fraction V (diols);
- 15 ml de méthanol: fraction VI (non volatils).

La fraction acide des cires est séparée en trois fractions:

- 15 ml de benzène: fraction A (acides et diacides gras);
- 15 ml de chloroforme: fraction B (hydroxy-acides);
- 15 ml de méthanol: fraction C (non volatils).

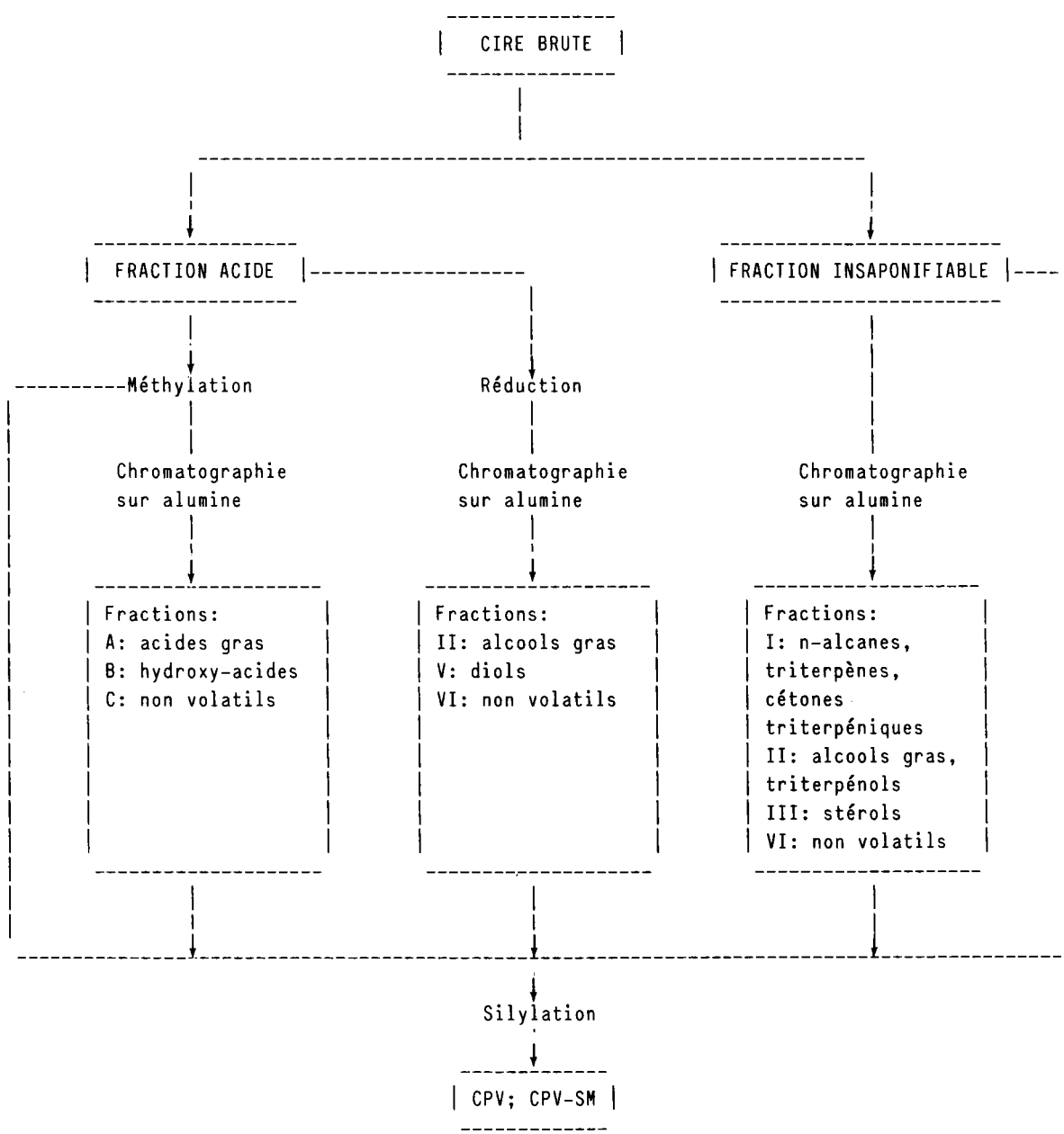


Fig. 11: Schéma de l'analyse chromatographique d'une cire.

I-3 Réduction de la fraction acide des cires.

Les phénomènes de recondensation par polyestérification dont nous avons déjà parlé (page 25) peuvent fausser les analyses qualitatives et quantitatives. Cet inconvénient peut être évité en réduisant les fonctions esters et acides par $LiAlH_4$ ou un réducteur équivalent. Nous avons choisi $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$ (sodium bis 2-méthoxy-éthoxy aluminium hydrure) en solution à 70% dans le benzène. Ce réactif présente l'avantage de réaliser la réduction en phase homogène, puisque le benzène est un bon solvant des cires. Le mode opératoire est adapté d'après (67) (voir annexe VII page 171). De cette façon les acides gras sont convertis en alcools et les hydroxy-acides en diols. Le préfractionnement sur alumine permet de séparer ces deux classes de composés (fraction II: alcools gras; fraction V: α-ω diols).

I-4 Schéma de l'analyse chromatographique des cires.

Les analyses chromatographiques des différents échantillons sont conduites suivant le schéma de la figure 11.

II- CHROMATOGRAPHIE EN PHASE VAPEUR.

II-1 Choix de la colonne.

II-1-1 Colonnes remplies.

De nombreux travaux ont été consacrés à la séparation des acides gras et des substances à longue chaîne. Les phases stationnaires les plus couramment utilisées sont des silicones. Initialement on utilisait des colonnes remplies c'est-à-dire contenant un support inerte (Chromosorb, Célite, etc) imprégné de phase stationnaire. Les taux d'imprégnation relativement élevés à l'origine (30 à 40%) ont été ramenés par la suite à moins de 5% en général, ce qui a permis de diminuer considérablement les temps de rétention des composés les plus lourds sans affecter la résolution.

La figure 12 nous montre comme exemple la séparation de la

cire Fa méthylée que nous avons obtenue sur une colonne OV-17 à 2,5%. La température maximale d'utilisation de cette colonne est de 280 °C. Les temps de rétention des termes les moins volatils sont diminués et la forme des pics correspondants est améliorée si l'on peut augmenter la température finale de la colonne jusqu'à 340 °C.

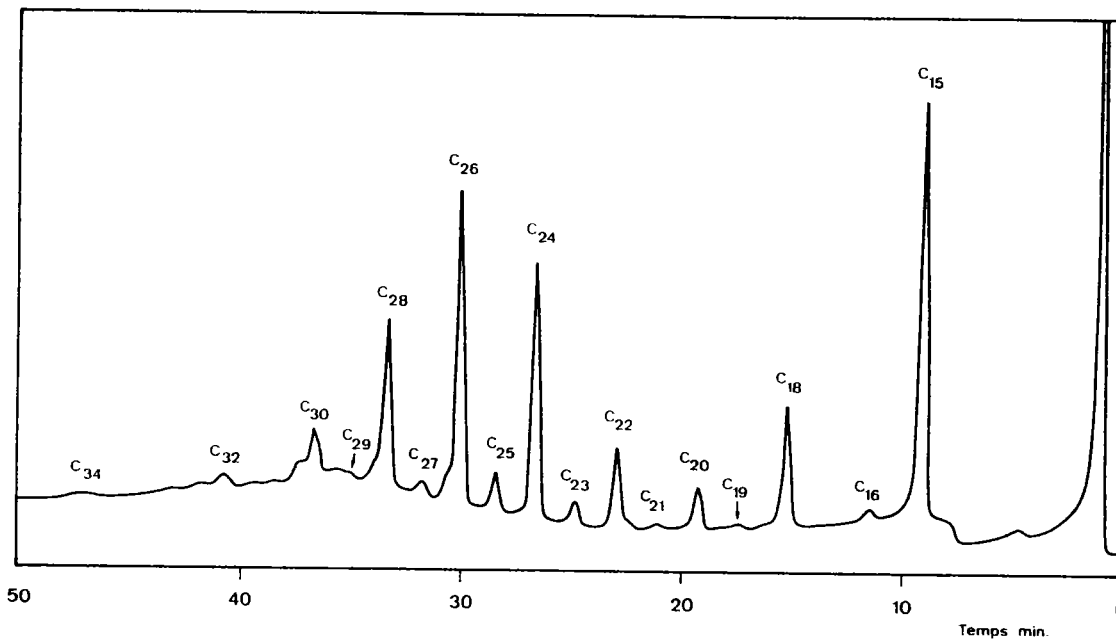


Fig. 12: CPV sur colonne OV-17 de la cire Fa méthylée (non silylée) en programmation linéaire de température de 140 °C à 280 °C, à raison de 4° par minute (étalon interne C15).

Nous avons renouvelé nos analyses lorsque sont apparues sur le marché des phases stationnaires qui répondent à ces contraintes, c'est-à-dire la phase "DEXSIL 300 GC" qui admet des températures maximales d'utilisation de 400 °C. De plus nous avons remplacé les colonnes en acier par des colonnes de verre plus délicates à installer, mais qui présentent une plus grande inertie chimique vis-à-vis des composés susceptibles de se décomposer sous l'effet catalytique de l'acier inoxydable (en particulier les dérivés silylés).

Les analyses quantitatives sont en général très satisfaisantes avec les colonnes remplies puisque l'échantillon est introduit en totalité dans le système chromatographique.

II-1-2 Colonnes capillaires.

De nos jours les colonnes remplies sont supplantées par les colonnes capillaires dont les parois internes sont revêtues d'un film très régulier de phase stationnaire, ce qui leur confère un très haut pouvoir de résolution allié à des temps d'analyse plus courts. L'apparition récente de colonnes capillaires en silice fondue, dont les principales propriétés sont l'efficacité, la flexibilité, l'inertie vis-à-vis des composés thermo-labiles, élimine les inconvénients des colonnes capillaires métalliques (décomposition catalytique) et des colonnes de verre (fragilité, difficulté d'installation dans le four du chomatographe).

II-2 Techniques d'injection.

L'utilisation de colonnes capillaires nécessite des techniques spéciales d'injection. Il y a principalement trois techniques d'injection:

- injection avec division du flux d'entrée;
- injection dite "splitless";
- injection directe dans la colonne dite "on column".

Dans ce dernier cas l'injection est effectuée à l'aide d'une aiguille dont le diamètre externe est légèrement inférieur au diamètre interne de la colonne capillaire (0,32 mm). L'échantillon est ainsi introduit directement et entièrement à l'intérieur de la colonne. Ce procédé présente l'avantage d'injecter les échantillons à basse température sans vaporisation préalable des différents constituants (50 °C à 100 °C). Ceci permet d'éviter les dégradations éventuelles qui peuvent se produire dans un injecteur classique dont la température est supérieure à la température finale de la colonne, c'est-à-dire fréquemment 300 °C. Les analyses quantitatives obtenues avec cette technique sont en général très satisfaisantes.

Notre chromatographe, un "PERKIN-ELMER F30", n'était pas conçu à l'origine pour fonctionner avec ces techniques d'injection. Nous l'avons d'abord adapté pour fonctionner avec les deux premières techniques citées ci-dessus. Ayant rencontré

divers problèmes de fuites, nous avons finalement opté pour l'injection "on column", ce qui a nécessité une nouvelle modification du chromatographe.

II-3 Dérivés pour la CPV.

II-3-1 Acides gras.

Bien que les acides gras les plus courts aient été initialement séparés sans transformation préalable, l'analyse des acides à longue chaîne n'est possible que s'ils sont transformés en dérivés volatils donnant des pics symétriques. Le plus généralement les acides gras sont chromatographiés sous forme de leurs esters méthyliques.

La préparation des esters méthyliques peut être effectuée par diverses méthodes:

- par action du diazométhane;
- estérification par le méthanol en présence d'un acide fort (H_2SO_4, BF_3);
- par le N-N diméthylformamide diméthyl acétal, selon la réaction:

$$R\text{-}COOH + (CH_3)_2N\text{-}CH(OCH_3)_2 \rightarrow R\text{-}COOCH_3 + CH_3OH + DMF$$

Cette dernière méthode, très pratique pour la méthylation des acides gras monofonctionnels n'est pas applicable lorsque l'échantillon contient des hydroxy-acides. Le diazométhane étant peu commode d'utilisation nous avons en général utilisé la deuxième méthode avec l'acide sulfurique concentré comme catalyseur (voir annexe III). Nous avons obtenu des résultats tout à fait analogues avec BF_3 en solution dans le méthanol.

II-3-2 Fonctions alcools.

Bien que les alcools gras, les stérols, les alcools triterpéniques puissent être élués dans certaines conditions à l'état libre, il est préférable de les chromatographier sous forme de dérivés volatils stables dans les conditions de l'analyse et donnant des pics symétriques. Les dérivés les plus

couramment utilisés sont:

- l'acétate obtenu par estérification de la fonction OH par l'anhydride acétique dans la pyridine;
- le trifluoroacétate obtenu par action du N-trifluoroacétyl-imidazole;
- l'éther triméthylsilylé obtenu selon la réaction:

$$R\text{-}OH + \text{agent silylant} \rightarrow R\text{-}OSi(CH_3)_3$$

(nous utiliserons la notation R-OTMSi).

Les deux derniers dérivés sont très faciles à préparer et les réactions sont quantitatives. Par contre nous n'avons pas obtenu de bons résultats pour la préparation des dérivés trifluoroacétylés des hydroxy-acides avant ou après méthylation. Nous avons donc préféré dans tous les cas la silylation des fonctions OH. Les principaux réactifs utilisés sont le N-O bis triméthylsilyl-acétamide (BSA) ou le N-triméthylsilyl-imidazole (N-TSIM). La silylation peut être effectuée dans différents solvants anhydres: benzène, chloroforme (exempt d'éthanol) et surtout la pyridine. Les dérivés facilement hydrolysables sont stockés à l'abri de l'humidité (voir préparation annexe VIII). Ces deux réactifs permettent dans les mêmes conditions d'estérifier les fonctions acides selon la réaction:

$$R\text{-}COOH + \text{BSA (ou N TSIM)} \rightarrow R\text{-}COOTMSi$$

En principe on peut ainsi obtenir les dérivés silylés des fonctions alcools et acides. Les esters TMSi des acides sont plus difficiles à obtenir et sont moins stables que les éthers R-OTMSi et les résultats des analyses par CPV que nous avons obtenus avec ces esters sont décevants.

II-3-3 Hydrocarbures et cétones.

Les hydrocarbures et les cétones aliphatiques ou triterpéniques sont suffisamment volatils et ne nécessitent pas de transformation.

En conclusion, les différentes fractions acides sont d'abord méthylées puis silylées, les fractions insaponifiables sont directement silylées.

II-4 Conditions expérimentales.

II-4-1 Colonnes remplies.

- Chromatographe "Perkin-Elmer F30" muni de deux colonnes et de deux détecteurs à ionisation de flamme.
- Températures de l'injecteur et de détection: 300°C.
- Température de colonne: 200 °C et 280 °C ou programmation linéaire de température à raison de 4 °C/minute.
- Gaz vecteur: azote; débit: 20 ml/minute.
- Pression d'air: 170 kN/m2.
- Pression d'hydrogène: 125 kN/m2.
- Colonnes en verre: longueur: 6 pieds; diamètre externe: 1/4 de pouce; phase stationnaire: OV-17 ou dexsil 300 GC, 2,5% sur Chromosorb G AW DMCS 80-100 mesh.

II-4-2 Colonnes capillaires.

Nous disposons de deux colonnes capillaires.

- Colonne CP-Sil 5 (apolaire, équivalente à OV-101, OV-1, SE-30); longueur 25 mètres; diamètre interne 0,32 mm permettant l'injection directe dans la colonne.
- Colonne CP-Sil 19 CB (semi-polaire équivalente à OV-17); mêmes caractéristiques.
- Gaz vecteur: hélium, pression à l'entrée de la colonne 1 bar.
- Température colonne: programmation linéaire de température de 80 °C à 340 °C à raison de 8 °C /minute.
- Les conditions de détection sont les mêmes que pour les colonnes remplies.
- Le chromatographe "Perkin-Elmer F30" est équipé d'un injecteur "on column" fourni par la société "CHROMPACK". La deuxième voie du chromatographe devenue inutile est supprimée.

II-5 Analyse isotherme.

II-5-1 Principe de l'identification des acides gras.

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 composé 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 C5.

$$n = m \log \frac{t_n - t_M}{t_0 - t_M} + n_0 \qquad (1)$$

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

t_0 : temps de rétention d'un composé choisi comme référence.

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

m et n_0 : 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 calculer t_M à partir d'un chromatogramme témoin de trois esters méthyliques d'acides gras normaux ayant n_1, n_2, n_3 atomes de carbone, et des temps de rétention t_1, t_2, t_3, on déduit de l'expression (1) les relations:

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

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

La résolution des équations (1), (2), (3) par approximations successives permet de déterminer le temps mort.

II-5-2 Résultats de l'analyse isotherme de l'échantillon Fa.

Pour obtenir l'élution de tous les acides gras il est nécessaire d'effectuer deux analyses, l'une à 200 °C pour les acides gras de C15 à C26, l'autre à 280 °C pour les acides gras de C18 à C34. La figure 13 représente les droites d'étalonnage à 200 °C et 280 °C:

$$y = \log (t_n - t_M)/(t_0 - t_M) = an + b .$$

Les cercles pleins correspondent aux acides gras témoins. Les cercles vides représentent les valeurs de y en fonction de la longueur de chaîne supposée n* des différents acides élués. On remarque que les points correspondants se placent sur la droite de référence.

On identifie de cette manière les acides gras de C16 à C34. Nous confirmerons plus loin par spectrométrie de masse la structure linéaire de ces acides.

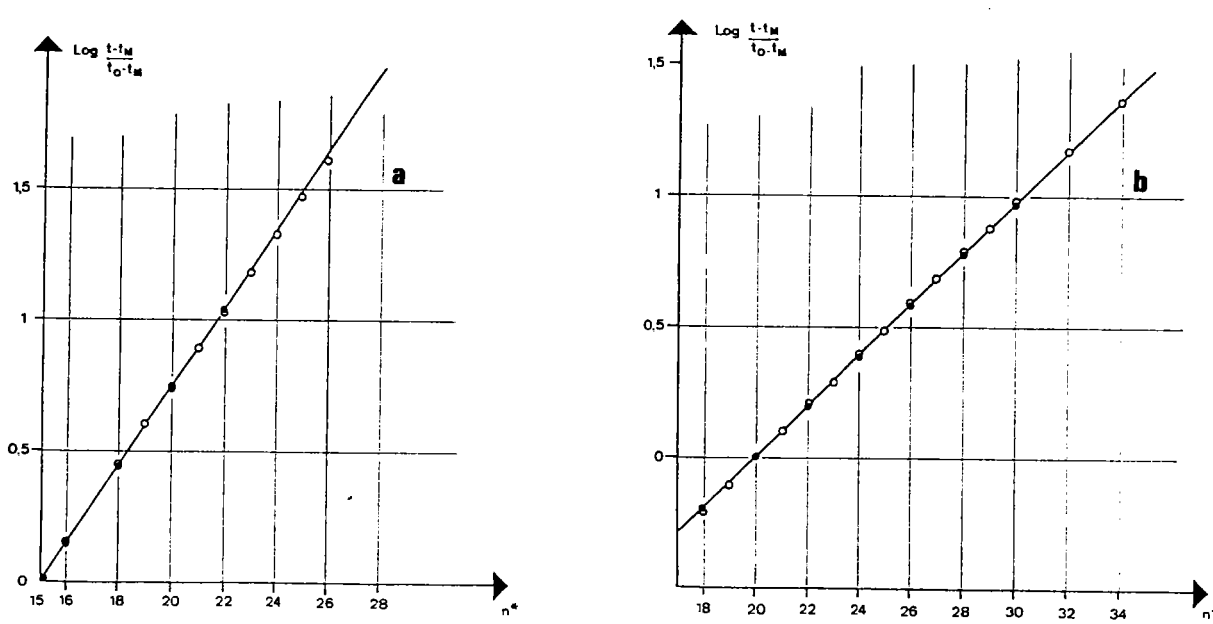


Fig. 13: Identification d'acides gras par analyse isotherme: a: 200 °C; b: 280 °C.

II-6 Analyse à température programmée.

II-6-1 Nécessité d'une programmation de température.

La séparation de tous les acides gras nécessite, comme on l'a vu, deux analyses isothermes. D'autre part la largeur des pics croît avec le temps de rétention. A concentration égale ceci se traduit par un aplatissement du pic gênant pour la détermination quantitative. Par ailleurs le pic du solvant peut masquer les composés rapidement élués. Il est donc avantageux d'opérer en programmation de température avec une température initiale relativement basse (140 °C avec les colonnes remplies et 80 °C avec les colonnes capillaires). La température finale doit permettre d'éluer les composés les plus lourds (340 °C). De cette façon on obtient des pics à peu près régulièrement espacés.

II-6-2 Identification des différents composés.

On ne peut évidemment plus appliquer la relation (1) pour l'identification des termes d'une même série homologue. On peut comparer les temps de rétention d'un composé avec celui d'un composé de référence si celui-ci est disponible ou mieux, par coinjection de l'échantillon et du témoin dans deux colonnes de polarités différentes, ce qui est le cas pour nos deux colonnes capillaires.

L'identification des acides gras de la cire Fa ayant été effectuée par la méthode ci-dessus et par spectrométrie de masse, on peut utiliser ceux-ci comme références pour les autres échantillons.

Par réduction du carboxyle en fonction alcool primaire ils servent également de références pour l'identification des alcools gras dans les diverses fractions insaponifiables.

Nous disposons des composés de référence suivants: acides gras de C16 à C30; α-ω diacides en C18 et C22; alcools gras en C16, C18, C20; n-alcanes de C19 à C40; acide hydroxy-16 hexadécanoïque.

La comparaison des temps de rétention des différents composés de référence et des composés identifiés par spectrométrie de

masse nous a permis d'établir les ordres d'élution ci-dessous, indépendants des conditions de pression du gaz vecteur ainsi que des conditions de température. Ces ordres sont d'ailleurs les mêmes d'une colonne à l'autre à condition que les phases stationnaires soient équivalentes.

Sur colonne CP Sil 5 l'ordre d'élution pour les fractions acides est le suivant:

acide gras Cn - alcool gras Cn - acide gras Cn+1 - diacide Cn-2 - ω-hydroxy-acide Cn-2 - acide gras Cn+2.

Pour fixer les idées, pour n = 24, on aura la séquence d'élution suivante (voir par exemple les pics 13 à 18, fig. 14, tableau VII):

acide tétracosanoïque (C24) - n-tétracosanol (C24) - acide pentacosanoïque (C25) - acide docosanedioïque (C22) - acide hydroxy-22 docosanoïque (C22) - acide hexacosanoïque (C26).

Le diacide en Cn-2 est élué environ 0,1 minute après l'acide en Cn+1.

Sur colonne CP Sil 19 CB cet ordre n'est modifié que pour le diacide Cn-2 et l'hydroxy-acide Cn-2 qui permutent, le diacide étant élué environ 0,1 minute avant l'acide Cn+2. Cette propriété permet d'identifier facilement les diacides gras.

L'ordre d'élution pour les fractions insaponifiables pour les deux colonnes est:

n-alcane Cn - alcool gras Cn-3 - acide gras (ester TMSi) Cn-3 - n-alcane Cn+1 - alcool gras Cn-2.

Exemple de séquence (pics 4 à 7 fig. 28, tableau XIV):

n-tricosane (C23) - n-eicosanol (C20) - acide eicosanoïque TMSi ester (C20) - n-pentacosane (C25) - n-docosanol (C22).

II-7 Analyse quantitative.

II-7-1 Principe.

La masse m_i de chaque soluté dans le 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 à l'échantillon à analyser une masse m_E de substance étalon, n'interférant pas avec les autres composés. On peut introduire un coefficient relatif:

$$f_i = \frac{K_i}{K_E} = \frac{m_i}{m_E} \times \frac{S_E}{S_i} \qquad (4)$$

Pour déterminer les coefficients f_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 $f_i = 1$. Dans ces conditions, la proportion x en % du constituant i dans le mélange est obtenue par l'expression:

$$x = \frac{100\ m_i}{m} = f_i \times \frac{S_i}{S_E} \times \frac{m_E \times 100}{m} \qquad (5)$$

où m représente la masse totale de la prise d'essai.

L'étalon interne est introduit dans l'échantillon avant transformation en dérivés adéquats pour l'analyse.

Nous utilisons les étalons internes suivants:

- acide heptadécanoïque (C17) pour l'analyse des fractions acides;
- n-eicosane (C20) pour l'analyse des hydrocarbures et des cétones dans les fractions insaponifiables;
- n-hexadécanol (C16) pour la détermination des alcools (aliphatiques ou alicycliques).

Dans les deux premiers cas les étalons internes sont initialement absents ou présents à l'état de traces dans les divers échantillons. Dans le dernier cas il faut tenir compte de la proportion initiale faible mais non négligeable de l'hexadécanol dans les différentes fractions insaponifiables. On peut déterminer cette proportion initiale (de l'ordre de 0,15% - 0,20%) avec une précision suffisante, d'après la relation (5) en effectuant une première analyse, avec le n-eicosane comme unique étalon interne et en admettant un coefficient de réponse $f_i = 1$.

Les concentrations en substance étalon dans les échantillons varient de 1% à 3%, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que les principaux composés identifiés.

Les proportions des différents constituants sont en général déterminées d'après le chromatogramme de l'échantillon non fractionné au préalable sur colonne d'alumine. Dans les zones complexes du chromatogramme, où il y a interférences entre divers pics, la détermination quantitative des composés correspondants est délicate voire impossible. Le préfractionnement est alors indispensable. Comme la substance étalon introduite dans l'échantillon ne peut se trouver dans toutes les fractions, on détermine d'abord, dans le mélange initial, la proportion d'un composé important et bien séparé de la fraction considérée. Ce composé servira alors d'étalon interne pour la détermination des autres composés.

II-7-2 Intégration des pics.

Initialement nous avons effectué l'intégration des différents pics par découpage du chromatogramme et pesée du papier. Cette méthode est bien sûr devenue inapplicable avec l'emploi des colonnes capillaires. Nous avons donc recommencé nos analyses lorsque nous avons pu disposer d'un intégrateur électronique ("INTERSMAT ICR-1"). Les différents paramètres d'intégration que nous avons adoptés sont donnés en annexe IX.

II-7-3 Etalonnage.

Les coefficients f_i de la relation (4) sont inconnus. Généralement pour les analyses complexes les auteurs admettent $f_i = 1$. Cette approximation est en général suffisante pour l'analyse de substances à longue chaîne dans des conditions chromatographiques correctes (programmation de température, absence de fuites de gaz vecteur, temps mort minimal).

Nous avons réalisé divers mélanges témoins avec l'acide heptadécanoïque comme référence, afin de vérifier la validité de cette approximation. Dans le tableau VI on trouvera, pour deux mélanges témoins d'acides gras, les proportions des divers constituants x théoriques et x expérimentales, déterminées

d'après la relation (5) en supposant $f_i = 1$, l'erreur relative $\Delta x/x$ en % et le coefficient de réponse f_i = x théor. / x exp. Nous donnons également les résultats obtenus avec des mélanges contenant les diacides en C18 et C22 ou l'acide 16-hydroxy-hexadécanoïque.

	Mélange I				Mélange II			
Acide	x théor %	x exp %	Δ x/x %	f_i	x théor %	x exp %	Δ x/x %	f_i
C16	1,60	1,38	13,9	1,16	5,91	5,04	14,7	1,17
C18	10,60	11,02	4,0	0,96	24,84	25,23	1,5	0,98
C19	1,20	1,24	2,9	0,97				
C20	3,65	3,83	4,8	0,95	9,12	9,15	0,4	1,00
C22	7,12	7,49	5,2	0,95	17,26	17,87	3,5	0,97
C23	1,93	1,93	0	1,00				
C24	23,04	22,98	0,3	1,00	17,43	17,62	1,0	0,99
C25	3,50	3,16	9,7	1,11				
C26	27,57	26,14	5,2	1,05	5,94	6,37	7,2	0,93
C28	15,01	15,56	3,6	0,96	10,63	10,71	0,7	0,99
C30	4,78	4,75	0,6	1,01	8,86	8,73	1,5	1,01
Total	100	99,5	0,5	0,995	100	100,7	0,7	1,01
Diacide C18	51,17	48,12	6,0	1,06				
Diacide C22	48,83	49,77	2,0	0,98				
Hydroxy acide C16	100	103,1	3,1	0,97				

TABLEAU VI: Analyse quantitative par CPV capillaire: étalonnage des acides gras.

On constate que les erreurs relatives dépassent rarement 6% (sauf pour le terme en C16 pour lequel nous pensons avoir eu des pertes au moment de l'évaporation du solvant), alors que l'écart entre le total des acides déterminés par CPV (Σ x exp.) et la proportion théorique totale (Σ x théor. = 100) est inférieure à 1% pour les deux mélanges d'acides gras. On observe d'ailleurs des variations des valeurs de x exp. du même ordre de grandeur pour un même mélange témoin ou échantillon d'une analyse à l'autre.

Nous considérons donc que la précision obtenue, en admettant des coefficients de réponse égaux à 1, est suffisante pour établir un bilan pondéral correct des composés des cires identifiables par CPV.

II-8 Résultats.

Dans les différents tableaux nous donnons les proportions x des divers constituants identifiés en % de l'échantillon injecté.

II-8-1 Tourbe "Floratorf".

a) Fraction acide Fa.

La figure 14 représente le chomatogramme de la fraction acide Fa. On remarque la prédominance des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone, principalement les acides tétracosanoïque (C24, pic 13) et hexacosanoïque (C26, pic 18), chacun représentant près du quart des acides gras normaux. Au total les acides gras constituent 17,3% de l'échantillon.

La deuxième classe de composés en importance est représentée par une série d'acides gras ω-hydroxylés de C16 à C28. La présence d'hydroxy-acides dans les cires de tourbe avait été supposée par RAUHALA (22), mais leur mise en évidence n'avait pu être menée à bien (21). Nous avons réussi cette mise en évidence par couplage CPV-spectrométrie de masse des esters méthyliques et éthers TMSi de l'hydroxyle (voir chap. V). Les termes en C22, C24, C26 sont les plus abondants pour un total de 6,4%.

Les α-ω diacides ne constituent qu'une fraction mineure (0,6% de l'échantillon).

On peut séparer les acides gras normaux et les diacides d'avec les hydroxy-acides par préfractionnement sur alumine (fraction A et B respectivement, voir fig. 11).

On remarque d'autre part (fig. 14) la présence d'alcools gras résiduels témoins d'une séparation imparfaite des acides et de l'insaponifiable.

Les pics 34 et 36 (fig. 14) correspondent à deux épimères de l'acide hopanoïque en C32 (formule Xc page 19). En effet, par réduction on obtient deux alcools dont les temps de rétention sont identiques à ceux des épimères du hopanol en C32 (formule Xd) que nous avons identifiés dans la fraction insaponifiable Fi (voir § c ci-dessous et chap. V).

Les composés élués ne représentent au total que 34,6% de l'échantillon (dont 29,3 % identifiés). Il y a donc 65,4% de composés insuffisamment volatils, même après méthylation et silylation pour se prêter à une analyse par CPV. La fraction C du préfractionnement ne contient d'ailleurs aucune substance volatile en CPV.

On peut penser que parmi ces composés non volatils on trouve des esters d'acides gras et d'alcools gras (cérides), d'acides gras et de stérols (stérides) ou encore des polyesters d'hydroxy-acides (estolides). Ces divers esters pourraient provenir d'une saponification incomplète ou d'une recondensation des hydroxy-acides sous forme d'estolides.

Bien que le spectre IR (fig. 5 page 32) montre un net déplacement de la bande à 1740 cm^{-1} vers 1700 cm^{-1}, ceci nous paraît insuffisant pour éliminer cette possibilité. Le chromatogramme d'échantillons anciens montre une disparition totale des hydroxy-acides, mais ils réapparaissent après une nouvelle saponification de l'échantillon.

Il nous a donc paru utile de trouver une méthode qui élimine ces inconvénients.

b) Fraction acide réduite Far.

Les réducteurs comme $LiAlH_4$ ou $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$ permettent de réduire les fonctions acides et esters selon les réactions (voir annexe VII):

$$R\text{-}COOH \longrightarrow R\text{-}CH_2OH$$
$$R\text{-}COOR' \longrightarrow R\text{-}CH_2OH + R'\text{-}OH.$$

Les produits ainsi obtenus ne sont plus susceptibles de recondensation ultérieure. En particulier les acides gras sont transformés en alcools gras et les hydroxy-acides et leurs polyesters en diols.

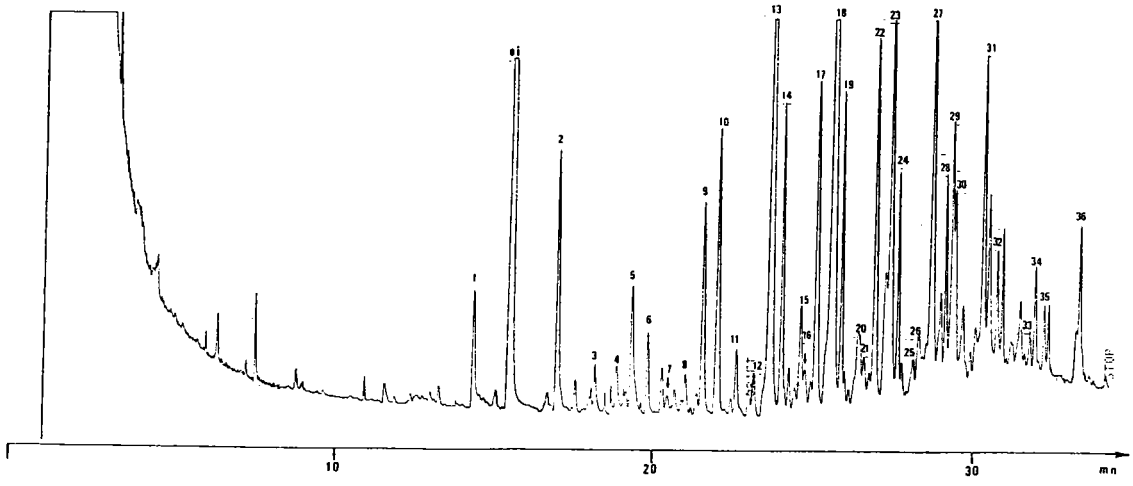


Fig. 14: Chromatogramme de la fraction acide Fa méthylée et silylée sur colonne capillaire CP Sil-5.

ei étalon interne:
acide heptadécanoïque (C17)
1 acide hexadécanoïque (C16)
2 acide octadécanoïque (C18)
3 acide nonadécanoïque (C19)
4 acide hydroxy-16 hexadécanoïque (C16)
5 acide eicosanoïque (C20)
6 n-eicosanol (C20)
7 acide heneicosanoïque (C21)
8 acide hydroxy-18 octadécanoïque (C18)
9 acide docosanoïque (C22)
10 n-docosanol (C22)
11 acide tricosanoïque (C23)
12 acide hydroxy-20 eicosanoïque (C20)
13 acide tétracosanoïque (C24)
14 n-tétracosanol (C24)
15 acide pentacosanoïque (C25)
16 acide docosanedioïque (C22)
17 acide hydroxy-22 docosanoïque (C22)
18 acide hexacosanoïque (C26)
19 n-hexacosanol (C26)
20 acide heptacosanoïque (C27)
21 acide tétracosanedioïque (C24)
22 acide hydroxy-24 tétracosanoïque (C24)
23 acide octacosanoïque (C28)
24 n-octacosanol (C28)
25 acide nonacosanoïque (C29)
26 acide hexacosanedioïque (C26)
27 acide hydroxy-26 hexacosanoïque (C26)
28 acide triacontanoïque (C30)
29 ß-sitostérol
30 ß-stigmastanol
31 acide hydroxy-28 octacosanoïque (C28)
32 acide dotriacontanoïque (C32)
33 acide hydroxy-30 triacontanoïque (C30)
34 acide homo-bis 30-31 hopane 32-oïque (isomère 17α-21β)
35 acide tétratriacontanoïque (C34)
36 acide homo-bis 30-31 hopane 32-oïque (épimère 17β-21β)

TABLEAU VII: Liste des composés identifiés par CPV dans la fraction acide Fa (fig. 14).

Les figures 15, 16 et 17 représentent respectivement les chromatogrammes de l'échantillon Far initial et des fractions II (alcools gras) et V (α-ω diols) résultant du préfractionnement sur alumine (voir page 42).

La comparaison des résultats quantitatifs obtenus pour l'échantillon Fa initial et l'échantillon réduit Far (tableau VIII) ne permet pas de mettre en évidence des variations sensibles des proportions des différents composés identifiés. Au total les substances non volatiles représentent 65% pour les

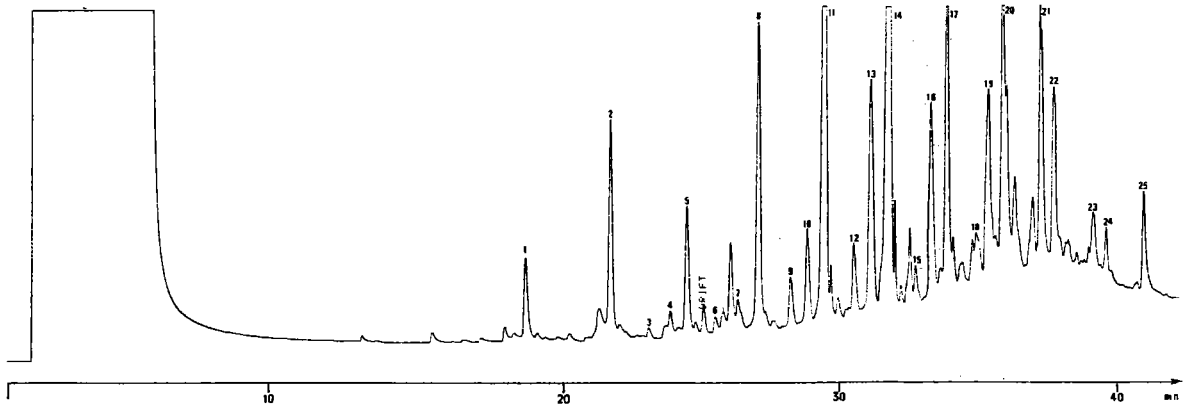


Fig.15: Chromatogramme de la fraction acide réduite Far sur colonne capillaire CP-Sil 19 CB.

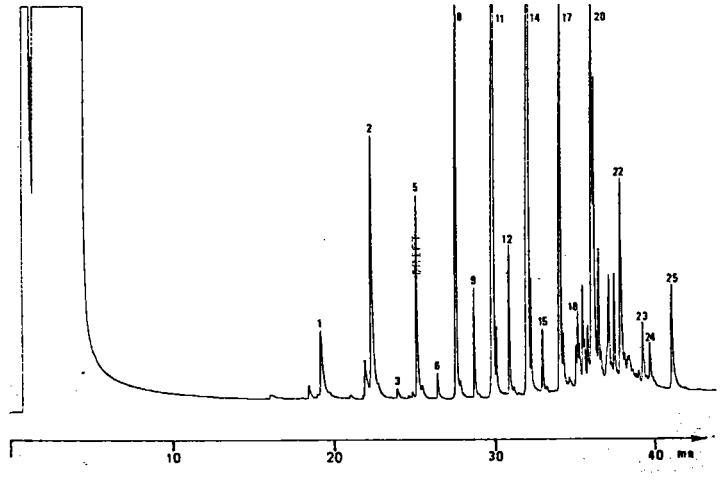


Fig.16 Chromatogramme de l'échantillon Far, fraction II, sur colonne capillaire CP-Sil 19 CB.

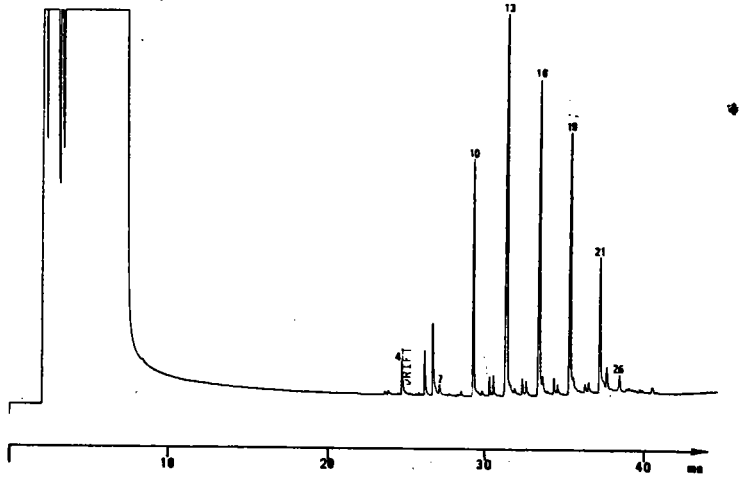


Fig.17 Chromatogramme de l'échantillon Far, fraction V, sur colonne capillaire CP-Sil 19 CB.

Nombre d'atomes de C	Echantillon Fa				Echantillon Far	
	Acides gras %	Alcools gras %	Diacides %	Hydroxy acides %	Alcools %	α-ω diols %
16	0,86			0,22	0,60	0,11
18	1,87			0,17	1,49	0,03
19	0,17				0,06	
20	0,62	0,31		0,14	0,84	0,64
21	0,16				0,10	0,06
22	1,17	1,18	0,19	1,37	1,89	1,67
23	0,47				0,31	0,05
24	3,24	0,99	0,30	1,35	3,72	1,07
25	0,55				0,45	0,05
26	4,05	0,79	0,15	1,88	3,87	0,93
27	0,77				0,17	0,04
28	1,92	0,60		1,24	1,70	0,50
29	0,29				0,06	
30	0,59			0,10	0,66	0,03
32	0,40				0,28	
34	0,19					
32*	0,30				0,17	
32**	0,73				0,59	
Total	18,35	3,9	0,64	6,4	17,0	5,2
Total identifiés	29,3				22,2	
Non identifiés	5,3				12,6	
Non volatils	65,4				65,4	

TABLEAU VIII: Analyse quantitative par CPV de la fraction acide Fa ("Floratorf") et de la fraction réduite Far (en % de l'échantillon injecté). * Acide n° 34, ** acide n° 36 (tableau VII).

1 n-hexadécanol (C16)
2 n-octadécanol (C18)
3 n-nonadécanol (C19)
4 hexadécanediol 1,16 (C16)
5 n-eicosanol (C20)
6 n-heneicosanol (C21)
7 octadécanediol 1,18 (C18)
8 n-docosanol (C22)
9 n-tricosanol (C23)
10 eicosanediol 1,20 (C20)
11 n-tétracosanol (C24)
12 n-pentacosanol (C25)
13 docosanediol 1,22 (C22)
14 n-hexacosanol (C26)
15 n-heptacosanol (C27)
16 tétracosanediol 1,24 (C24)
17 n-octacosanol (C28)
18 n-nonacosanol (C29)
19 hexacosanediol 1,26 (C26)
20 n-triacontanol (C30)
21 octacosanediol 1,28 (C28)
22 n-dotriacontanol (C32)
23 homo-bis 30-31 hopane ol-32 (épimère 17α -21β)
24 n-tétratriacontanol (C34)
25 homo-bis 30-31 hopane ol-32 (épimère 17β -21β)
26 triacontane diol 1,30 (C30)

TABLEAU IX: Liste des composés identifiés dans l'échantillon Far (fig. 15, 16 ,17).

deux échantillons. Ceci montre qu'il ne s'agit pas d'esters ou de polyesters.

Enfin notons qu'on trouve dans la fraction I de l'échantillon Far des alcanes et des triterpénoïdes que nous avons inclus dans les composés volatils non identifiés. Ils proviennent en fait d'une séparation imparfaite de l'insaponifiable d'avec les acides. Ces composés sont décrits dans le paragraphe suivant.

c) Fraction insaponifiable Fi.

Les résultats sont résumés par les tableaux X et XI et les chromatogrammes fig. 18, 19, 20, 21.

La fraction I contient des n-alcanes, principalement à nombre impair d'atomes de carbone, avec prédominance des alcanes en C29, C31 et C33. Au total les n-alcanes ne représentent que 2% de l'échantillon injecté.

Ces n-alcanes sont accompagnés dans la fraction I (fig. 19) par divers triterpénoïdes pentacycliques (identifiés par spectrométrie de masse), parmi lesquels on trouve des hydrocarbures (taraxérène, hopène, homohopane) et des cétones (taraxérone, friedeline). Au total les triterpénoïdes de cette fraction dont nous avons pu enregistrer les spectres de masse représentent 4,2% de l'échantillon Fi.

Les alcools gras et les alcools triterpéniques élués dans la fraction II (fig. 20) constituent une classe de composés plus importante. Les alcools gras prédominants sont à nombre pair d'atomes de carbone, principalement les termes en C22, C24 et C26, avec un total de 7% de l'échantillon injecté.

Les alcools triterpéniques identifiés par spectrométrie de masse comportent tous cinq cycles, saturés (friedelanol, épimères 17α-21β et 17β-21β du hopanol en C32) ou avec une double liaison (taraxérol, moréténol, cyclolaudénol, α-amyrine et β-amyrine).

Nous exposerons en détail dans le chapitre V l'identification et les formules de ces composés. On trouvera en annexe X (page 172) la correspondance entre les noms usuels de ces triterpénoïdes et la nomenclature officielle.

Dans la fraction III (fig. 21) on trouve les composés les plus abondants de la fraction insaponifiable, c'est-à-dire les stérols, dont les plus importants sont le β-sitostérol (7%,

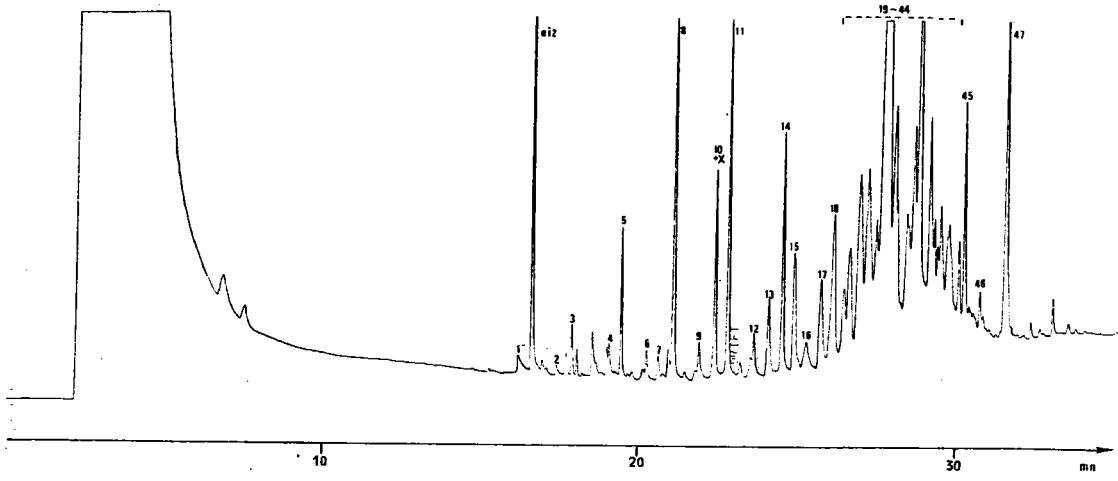


Fig. 18: Chromatogramme de la fraction insaponifiable Fi sur colonne capillaire CP-Sil 5.

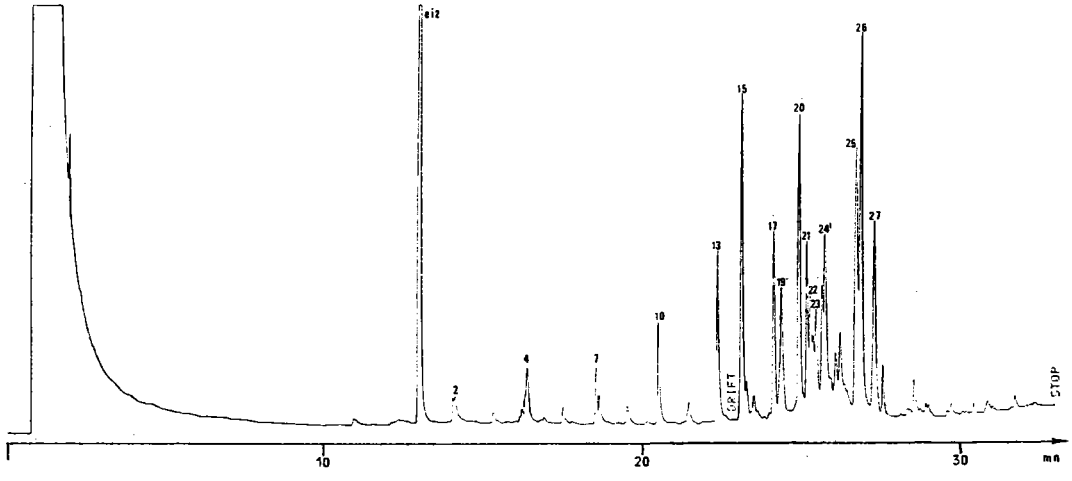


Fig. 19: Chromatogramme de la fraction insaponifiable Fi, fraction I, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

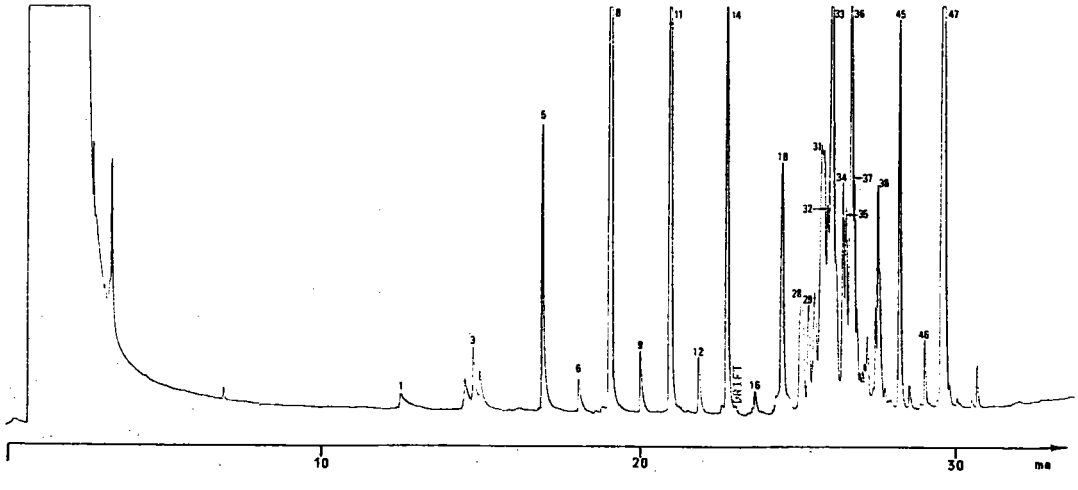


Fig. 20: Chromatogramme de la fraction insaponifiable Fi, fraction II, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

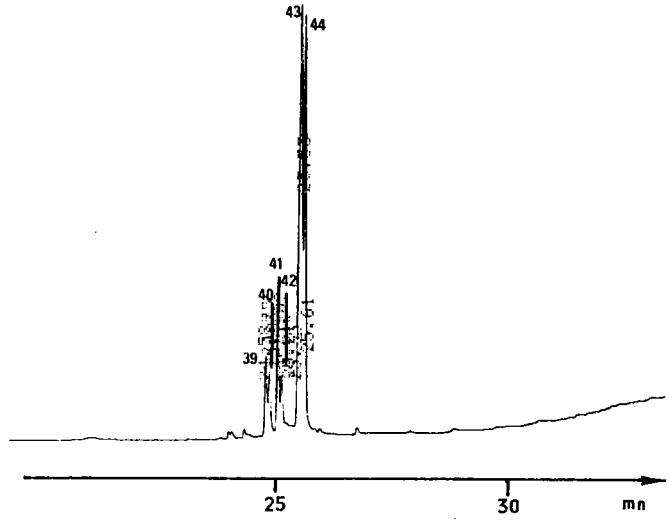


Fig. 21: Chromatogramme de la fraction insaponifiable Fi, fraction III, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

ei1: étalon interne 1 et
1 n-hexadécanol (C16)
ei2: étalon interne 2:
n-eicosane (C20)
2 n-heneicosane (C21)
3 n-octadécanol (C18)
4 n-tricosane (C23)
5 n-eicosanol (C20)
6 n-heneicosanol (C21)
7 n-pentacosane (C25)
8 n-docosanol (C22)
9 n-tricosanol (C23)
10 n-heptacosane (C27)
11 n-tétracosanol (C24)
12 n-pentacosanol (C25)
13 n-nonacosane (C29)
14 n-hexacosanol (C26)
15 taraxérène
16 n-heptacosanol (C27)
17 n-hentriacontane (C31)
18 n-octacosanol (C28)
19 hopène B
20 30-homohopane (C31)
21 taraxérone
22 triterpénoïde F5 (C30H48O)
23 3-stigmastanone
24 n-tritriacontane (C33)
25 épi-friedelanol (non silylé)
26 friedeline
27 Triterpénoïde F8 (C30H48O)
28 β-stigmastanol (5βH)
29 taraxérol
30 β-amyrine
31 α-amyrine
32 n-triacontanol (C30)
33 triterpénoïde F12
34 triterpénoïde F13
35 moréténol
36 épi-friedelanol
37 cyclolaudénol
38 n-dotriacontanol (C32)
39 campestérol
40 campestanol
41 stigmastérol
42 stigmasta-22-ène-3ol
43 β-sitostérol
44 β-stigmastanol (5αH)
45 homo-bis 30-31 hopane 32-ol (17α -21β)
46 n-tétratriacontanol (C34)
47 homo-bis 30-31 hopane 32-ol (17β -21β)

TABLEAU X : Liste des composés identifiés dans la fraction insaponifiable Fi (fig. 18 à 21).

composé Ia, page 18) et son homologue saturé le β-stigmastanol (4,2%) (IIa, épimère 5 α H). Les stéroïdes identifiés interviennent pour 15,6% de la fraction insaponifiable.

Au total 48% seulement de l'échantillon émergent de la colonne capillaire: comme dans la fraction acide on trouve une proportion importante de substances non volatiles (52%), ce qui est illustré par exemple par le chromatogramme quasiment vierge obtenu avec les cires collectées dans la fraction VI.

Aliphatiques			Triterpénoïdes		Stéroïdes	
Atomes de C	Alcools gras	n-alcanes	Hydrocarbures		Stérols	
16	0,10		taraxérène	0, 81	campestérol	0,90
18	0,21		hopène B	0,43	campestanol	0,68
20	0,51		30-homohopane	0,83	stigmastérol	1,70
21	0,09	0,09			Δ 22 stigmasta-3-énol	0,58
22	1,82	0,03	total	2,1	β -sitostérol	7,00
23	0,12	0,11			β -stigmastanol (5β H)	0,40
24	1,45	0,04	Cétones		β -stigmastanol (5α H)	4,17
25	0,12	0,11				
26	1,04	0,07	taraxérone	0,37		
27	0,09	0,24	triterpénoïde F5	0,28		
28	0,69	0,04	friedeline	0,98		
29		0,40	triterpénoïde F8	0,55		
30	0,54		total	2,2	total	15,4
31		0,46				
32	0,15		Alcools		Cétones	
33		0,45				
34	0,10		taraxérol	0,29	3-stigmastanone	0,22
			β -amyrine	0,33		
			α -amyrine	0,37		
			triterpénoïde F12	1,75		
			triterpénoïde F13	0,39		
			morétenol	0,34		
			épi-friedelanol	2,04		
			cyclolaudénol	0,25		
			C32-hopanol (17α -21β)	0,73		
			C32 hopanol (17β -21β)	2,00		
			total	8,5		
Total	7,0	2,0		12,8		15,6
Total identifiés		37,4	Non identifiés	10,6	non volatils	52,0

TABLEAU XI: Analyse quantitative de la fraction insaponifiable Fi ("Floratorf") en % de l'échantillon injecté.

II-8-2 Tourbe de Vitrimont.

a) Fractions acides V0a et V1a.

Les figures 22 à 27 nous montrent les chromatogrammes des cires V0a et V1a prélevées respectivement en surface et à 80 cm de profondeur, ainsi que ceux de leurs fractions A et B obtenues par préfractionnement sur alumine. Les résultats des analyses sont exposés tableaux XII et XIII. La fraction A contient des acides gras normaux, des alcools gras résiduels et des diacides gras. La fraction B contient des ω-hydroxy-acides et la fraction C ne contient pas de substances volatiles en CPV.

Ces deux échantillons présentent des chromatogrammes assez différents. Dans l'échantillon de surface V0 on trouve davantage d'acides gras à chaîne relativement courte de C14 à C20 (17,9% de l'échantillon injecté), avec un maximum pour l'acide eicosanoïque (C20) (12,4%), alors que les acides gras supérieurs sont moins abondants (4,5%). Cette situation s'inverse pour l'échantillon V1: on retrouve une répartition tout à fait analogue à celle de la tourbe "Floratorf". Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par EKMAN E (33): les acides gras C16-C20 prédominent dans les plantes des tourbières, tandis que les acides gras C22-C32 prédominent dans les tourbes. Ceci montre que l'échantillon V0 contient davantage de végétaux incomplètement décomposés.

Ces acides gras sont accompagnés par une faible proportion d'α-ω diacides, principalement en C22, C24 et C26.

L'étude des chromatogrammes des cires V0a, V1a et de leurs fractions B permet de mettre en évidence des ω-hydroxy-acides. Leurs proportions sont relativement importantes dans les deux échantillons (8% pour V0 et 18,4% pour V1). Les principaux ω-hydroxy-acides identifiés sont les acides en C22, C24, C26 et C28, tout comme dans la tourbe "Floratorf". Leur structure a également été confirmée par spectrométrie de masse.

On trouve également dans ces deux échantillons une fraction importante de substances non volatiles (54% pour l'échantillon V0a et 42% pour V1a).

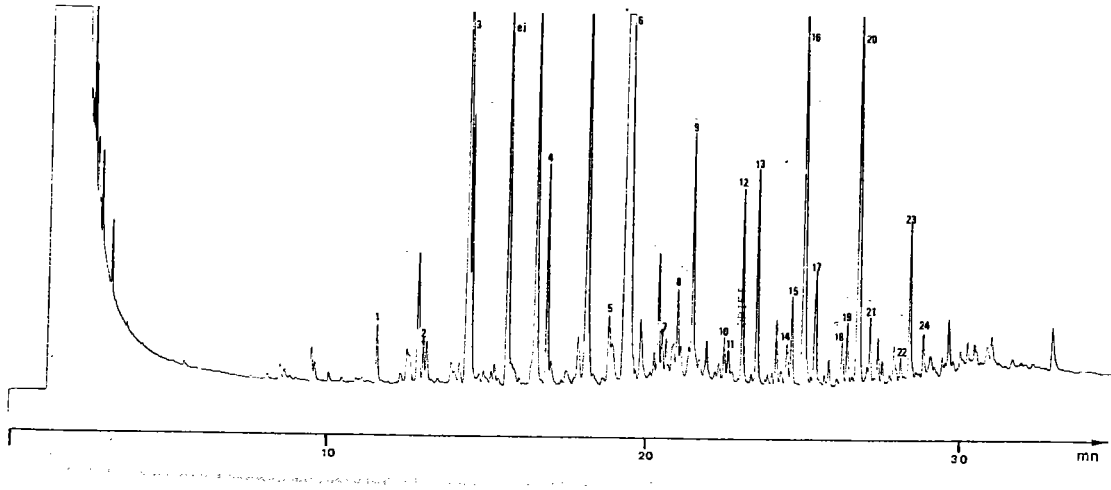


Fig. 22: Chromatogramme de la fraction acide VOa (Vitrimont 0-10 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

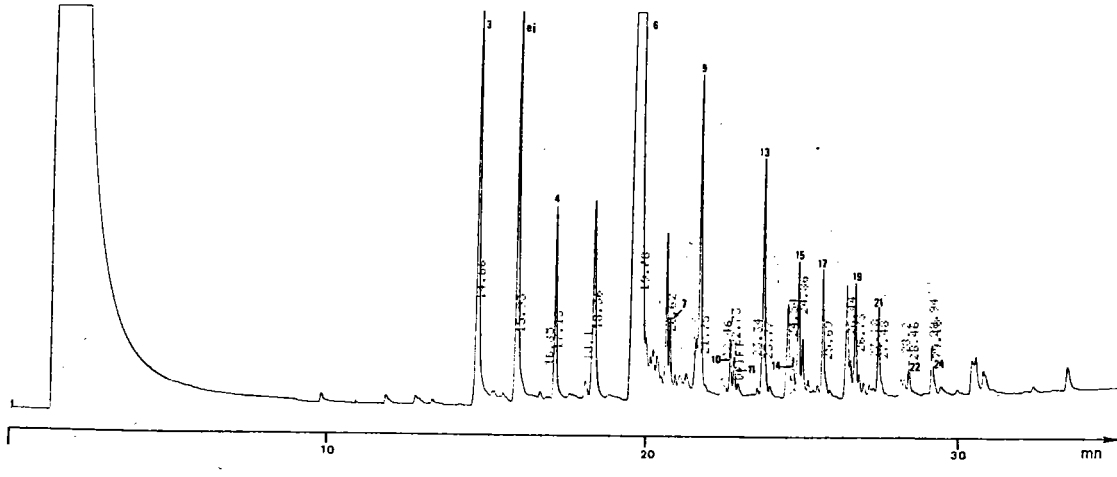


Fig. 23: Chromatogramme de la cire VOa, fraction A, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

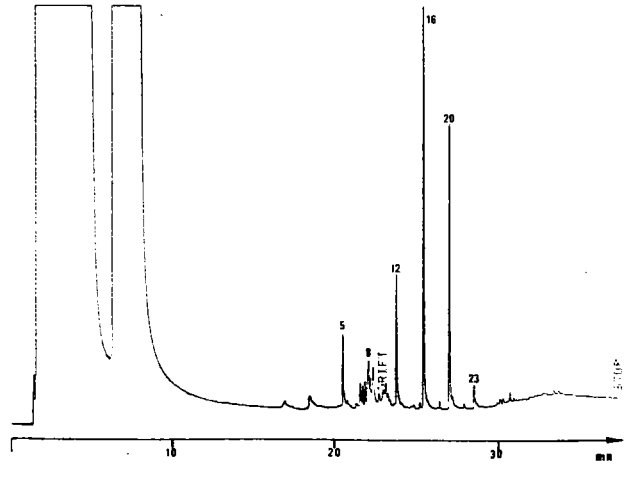


Fig. 24: Chromatogramme de la cire VOa, fraction B sur colonne capillaire CP-Sil 5.

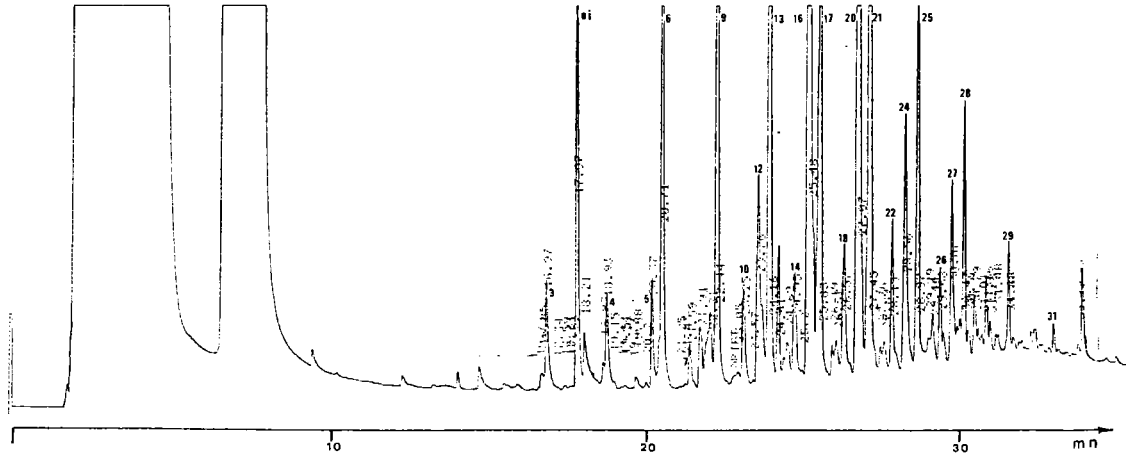


Fig. 25: Chromatogramme de la fraction acide V1a (Vitrimont 80 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

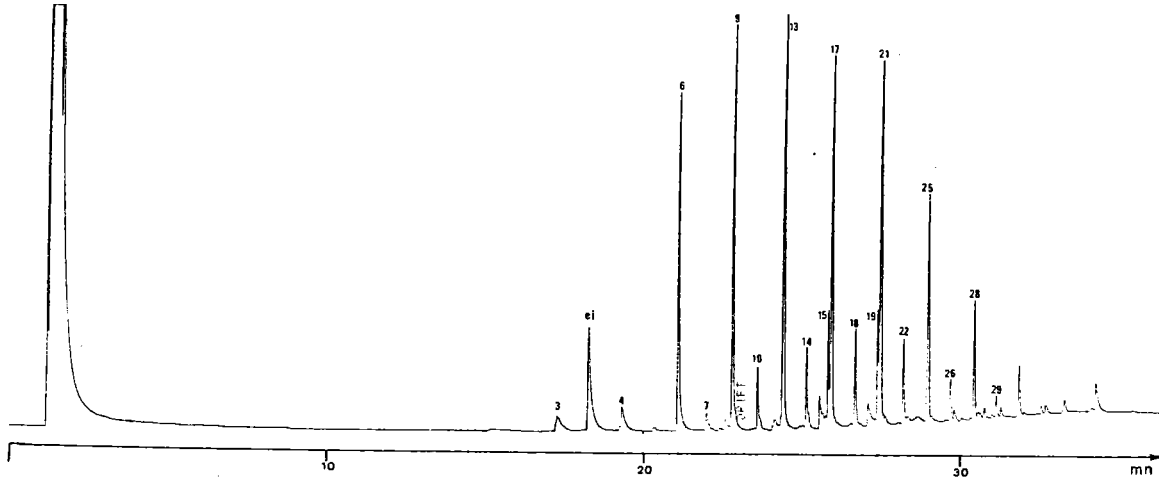


Fig. 26: Chromatogramme de la cire V1a, fraction A sur colonne capillaire CP-Sil 5.

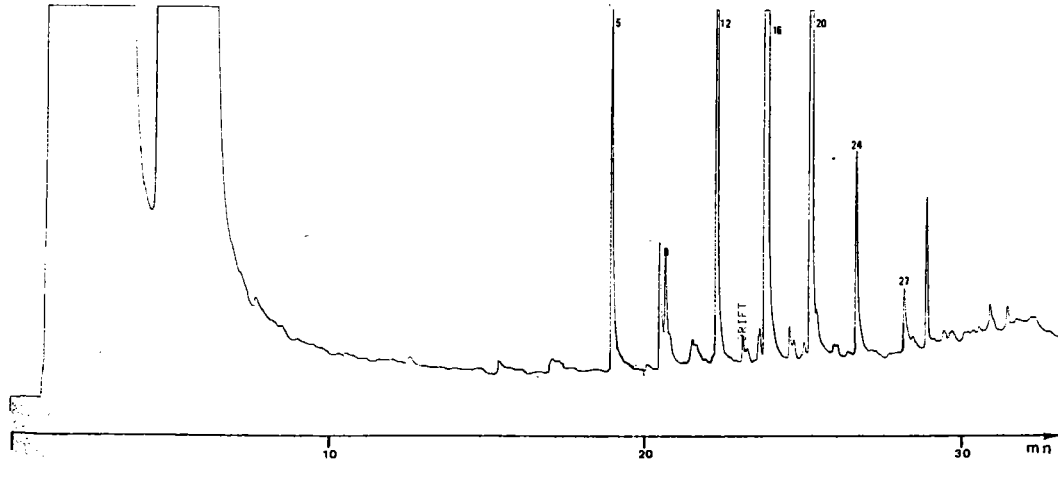


Fig. 27: Chromatogramme de la cire V1a; fraction B, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

ei étalon interne:
acide heptadécanoïque (C17)
1 acide tétradécanoïque (C14)
2 acide pentadécanoïque (C15)
3 acide hexadécanoïque (C16)
4 acide octadécanoïque (C18)
5 acide hydroxy-16 hexadécanoïque (C16)
6 acide eicosanoïque (C20)
7 acide heneicosanoïque (C21)
8 acide hydroxy-18 octadécanoïque (C18)
9 acide docosanoïque (C22)
10 acide tricosanoïque (C23)
11 acide eicosanedioïque (C20)
12 acide hydroxy-20 eicosanoïque (C20)
13 acide tétracosanoïque (C24)
14 acide pentacosanoïque (C25)
15 acide docosanedioïque (C22)
16 acide hydroxy-22 docosanoïque (C22)
17 acide hexacosanoïque (C26)
18 acide heptacosanoïque (C27)
19 acide tétracosanedioïque (C24)
20 acide hydroxy-24 tétracosanoïque (C24)
21 acide octacosanoïque (C28)
22 acide nonacosanoïque (C29)
23 acide hexacosanedioïque (C26)
24 acide hydroxy-26 hexacosanoïque (C26)
25 acide triacontanoïque (C30)
26 acide hentriacontanoïque (C31)
27 acide hydroxy-28 octacosanoïque (C28)
28 acide dotriacontanoïque (C32)
29 acide tritriacontanoïque (C33)
30 acide tétratriacontanoïque (C34)
31 acide hexatriacontanoïque (C36)

TABLEAU XII: liste des composés identifiés par CPV dans les fractions acides V0a et V1a (fig. 22 à 27).

b) Fractions insaponifiables V0i et V1i (fig. 28-32, tableaux XV et XVI).

Par préfractionnement des deux échantillons on isole des n-alcanes de C21 à C33 accompagnés de quelques triterpénoïdes (fraction I). Les proportions de ces n-alcanes sont relativement faibles comme dans la cire Fi (1,2% de l'échantillon pour V0i et 4% pour V1i). Dans cette fraction nous avons également identifié des triterpénoïdes, principalement la friedeline dont la proportion diminue avec la profondeur du prélèvement (6,8% dans V0i contre 0,59% dans V1i). Nous pensons que le phénomène est là encore lié à la présence de végétaux peu décomposés dans l'échantillon de surface, principalement de racines.

La fraction II contient des alcools gras de C16 à C32 dont la proportion augmente avec la profondeur (8,8% dans V0i et 24,3% dans V1i).

Dans la fraction III nous mettons en évidence les mêmes stérols que dans la tourbe "Floratorf", c'est-à-dire le ß-sitostérol et le ß-stigmastanol (9,5% et 5,9% respectivement pour V0i et V1i).

Les spectres de masse obtenus par couplage CPV-SM (voir chapitre V) nous ont permis d'identifier deux autres

triterpénoïdes: le Δ 9-11 fernène 3-ol méthyl-éther (pic CPV n° 22 fig. 28, formule XVI p. 133) qui est élué avec le β-stigmastanol (pic n° 21); l'uvaol (pic n° 25, formule IV-5 p. 132).

Nombre d'atomes de C	Acides gras		Alcools gras		α-ω diacides		ω-hydroxy-acides	
	V0	V1	V0	V1	V0	V1	V0	V1
14	0,28							
15	0,18							
16	3,38	0,93					0,44	0,73
18	0,95	0,47					0,47	0,46
19	0,67	0,11						
20	12,41	2,83		0,16	0,25		0,80	1,46
21	0,24	0,21					0,04	0,10
22	1,36	3,45		0,64	0,32	0,85	2,69	6,70
23	0,22	0,68					0,11	0,22
24	0,94	4,38		0,57	0,29	0,99	2,48	5,78
25	0,24	0,66					0,15	0,15
26	0,66	3,98		0,45	0,09	0,29	0,67	1,50
27	0,27	0,83						0,10
28	0,24	3,78		0,56		0,21	0,17	1,03
29		0,74						
30	0,19	2,41		0,50				0,14
31		0,41						
32	0,21	0,91						
33		0,13						
34		0,35						
36		0,08						
Total	22,4	27,3		2,9	1,0	2,3	8,0	18,4
Total identifiés	31,4	50,9						
Non identifiés	14,3	7,3						
Non volatils	54,3	41,8						

TABLEAU XIII: Analyse quantitative des fractions acides V0a et V1a (Vitrimont) (en % de l'échantillon injecté).

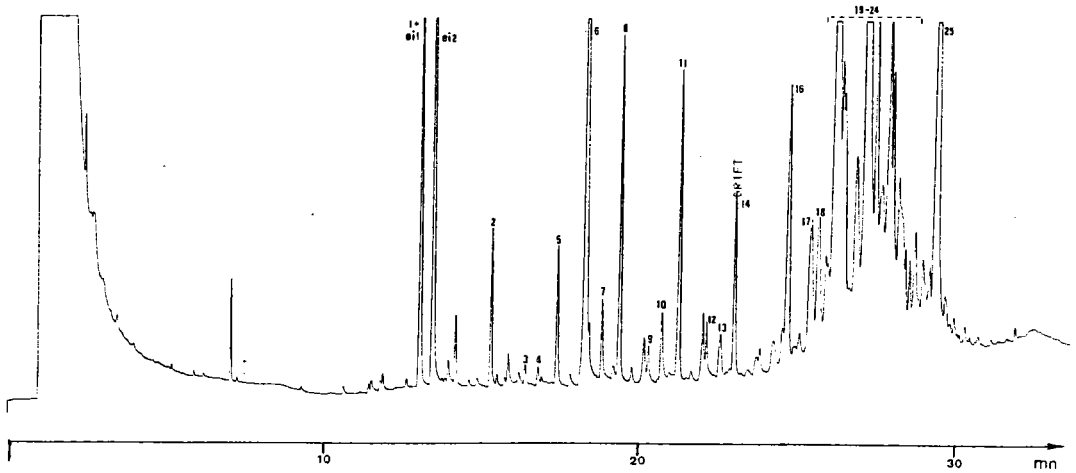


Fig. 28: Chromatogramme de la fraction insaponifiable VOi (Vitrimont 0-10 cm) sur colonne capillaire CP Sil 5.

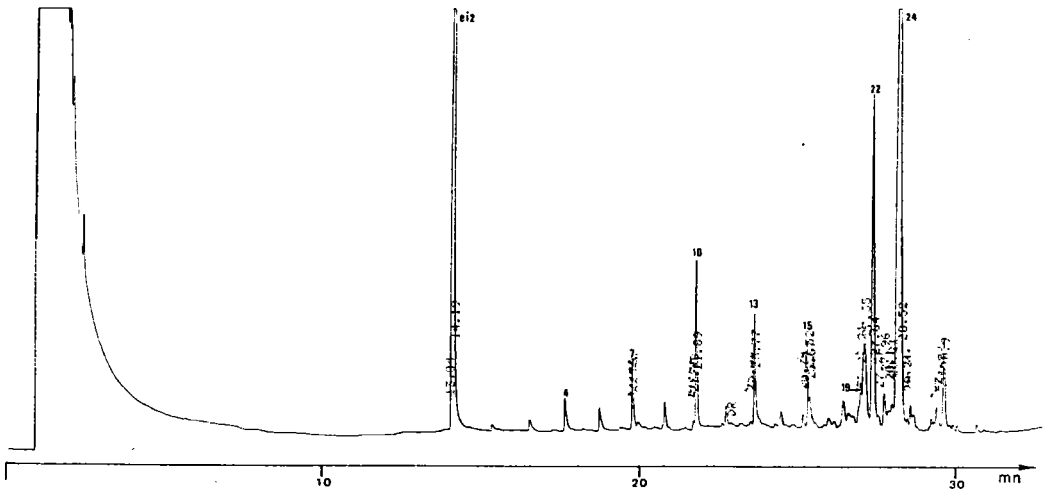


Fig. 29: Chromatogramme de la cire VOi, fraction I sur colonne capillaire CP-Sil 5.

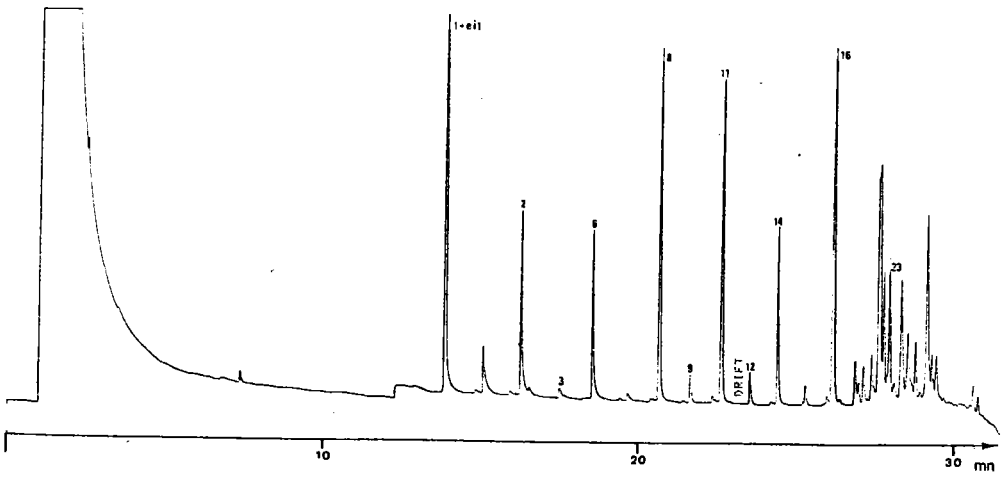


Fig. 30: Chromatogramme de la cire VOi, fraction II sur colonne capillaire CP-Sil 5.

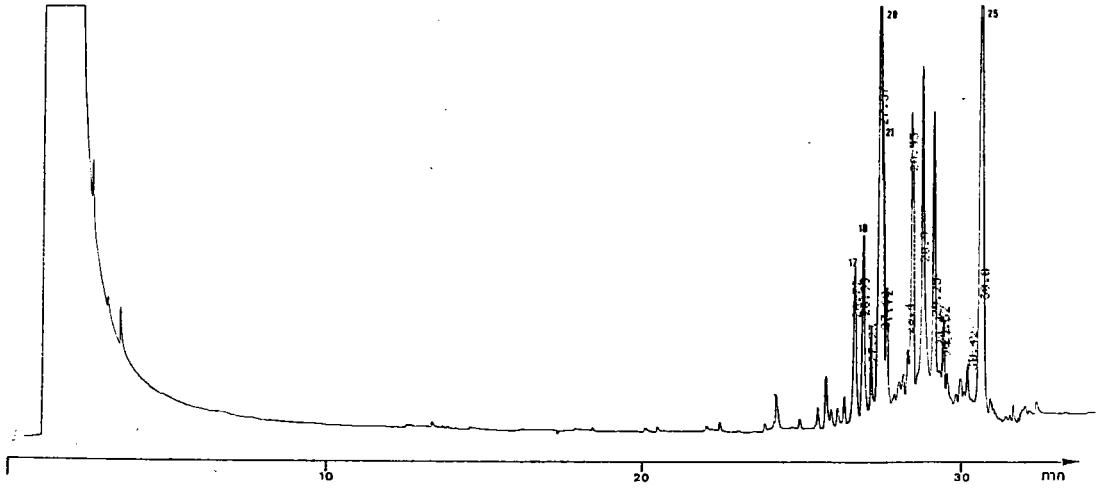


Fig. 31: Chromatogramme de la cire V0i, fractions III à V sur colonne capillaire CP-Sil 5.

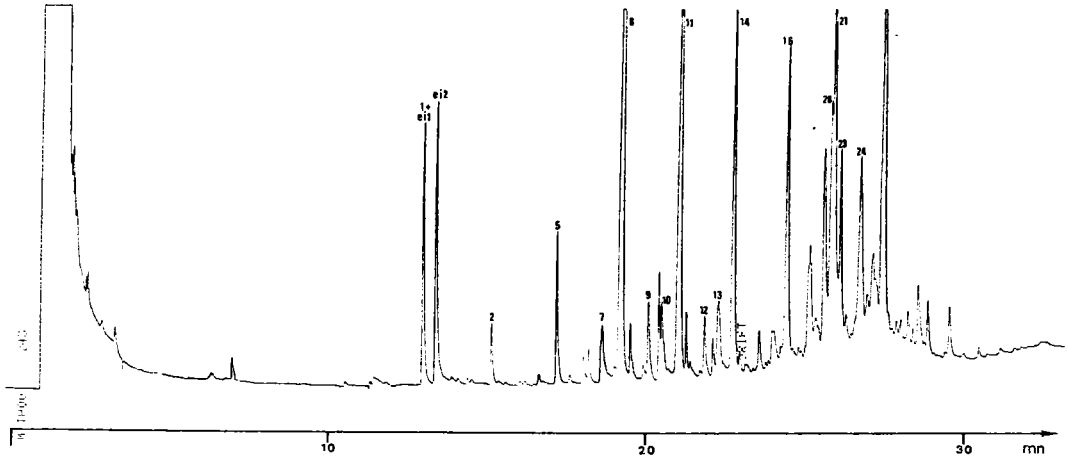


Fig. 32: Chromatogramme de la fraction insaponifiable V1i sur colonne capillaire CP-Sil 5.

ei1: étalon interne 1 et
1 n-hexadécanol (C16)
ei2: étalon interne 2:
n-eicosane (C20)
2 n-octadécanol (C18)
3 n-nonadécanol (C19)
4 n-tricosane (C23)
5 n-eicosanol (C20)
6 acide eicosanoïque TMSi ester (C20)
7 n-pentacosane (C25)
8 n-docosanol (C22)
9 n-tricosanol (C23)
10 n-heptacosane (C27)
11 n-tétracosanol (C24)
12 n-pentacosanol (C25)
13 n-nonacosane (C29)
14 n-hexacosanol (C26)
15 n-hentriacontane (C31)
16 n-octacosanol (C28)
17 campestérol
18 stigmastérol
19 n-tritriacontane (C33)
20 ß-sitostérol
21 ß-stigmastanol
22 fernénol méthyl-éther
23 n-triacontanol (C30)
24 friedeline
25 uvaol

TABLEAU XIV: Liste des composés identifiés dans les fractions insaponifiables V0i et V1i (fig. 28-32).

Nombre d'atomes de C	Alcools gras		n-alcanes		Stéroïdes-triterpénoïdes		
	V0	V1	V0	V1	Nom	V0	V1
16	0,22	0,15			campestérol	1,35	
18	0,67	0,43			stigmastérol	1,23	
19	0,05				ß-sitostérol	5,30	2,20
20	0,80	0,98			ß-stigmastanol	1,59	3,70
21	0,04	0,26		0,05	friedeline	6,80	0,59
22	1,93	6,94	0,04		uvaol	5,00	
23	0,15	0,63	0,09	0,17	fernénol		
24	1,51	5,60	0,06	0,08	méthyl-éther	0,90	0,47
25	0,14	0,45	0,15	0,73			
26	0,94	3,44	0,08		total	22,2	6,9
27	0,12	0,32	0,32	0,64			
28	1,75	3,00	0,04	0,19	autres:		
29			0,24	0,86	acide C20	4,15	
30	0,45	1,70	0,04	0,06			
31			0,09	0,64			
32		0,35		0,05			
33				0,30			
35				0,18			
Total	8,8	24,3	1,2	4,0		26,3	6,5
Total identifiés	36,3	35,2					
Non identifiés	20,7	16,8					
Non volatils	43	48					

TABLEAU XV: Analyse quantitative des fractions insaponifiables V0i et V1i (Vitrimont 0-10 cm et 80 cm) en % de l'échantillon injecté.

II-8-3 Anmoor de Lachaussée.

a) Fractions acides L0a et L1a.

Dans ces deux échantillons prélevés respectivement à 0-10 cm et 10-20 cm nous avons mis en évidence, comme dans les échantillons de tourbes, des acides gras de C16 à C34 (fraction A), des ω-hydroxy-acides de C16 à C28 (fraction B) dont la structure a été confirmée par spectrométrie de masse et des

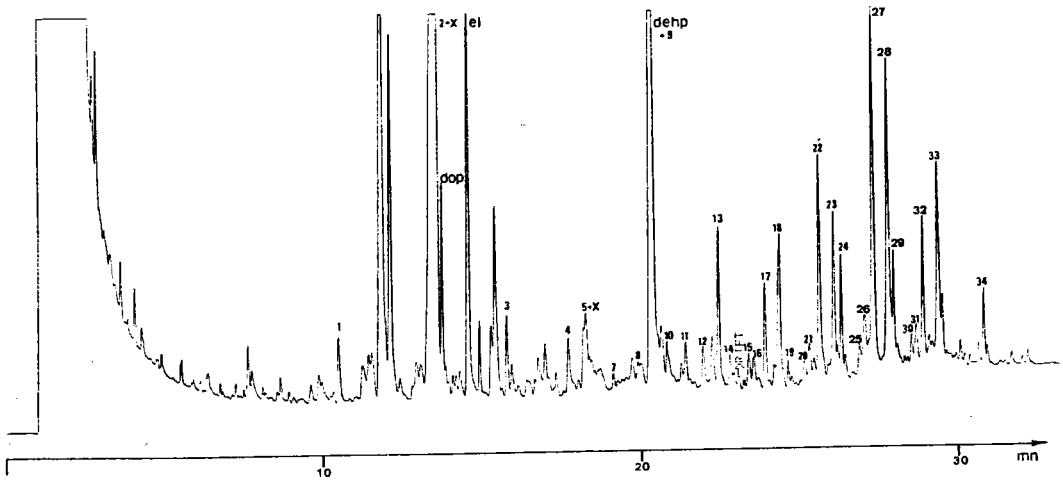


Fig. 33: Chromatogramme de la fraction acide L0a (anmoor de Lachaussée 0-10 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

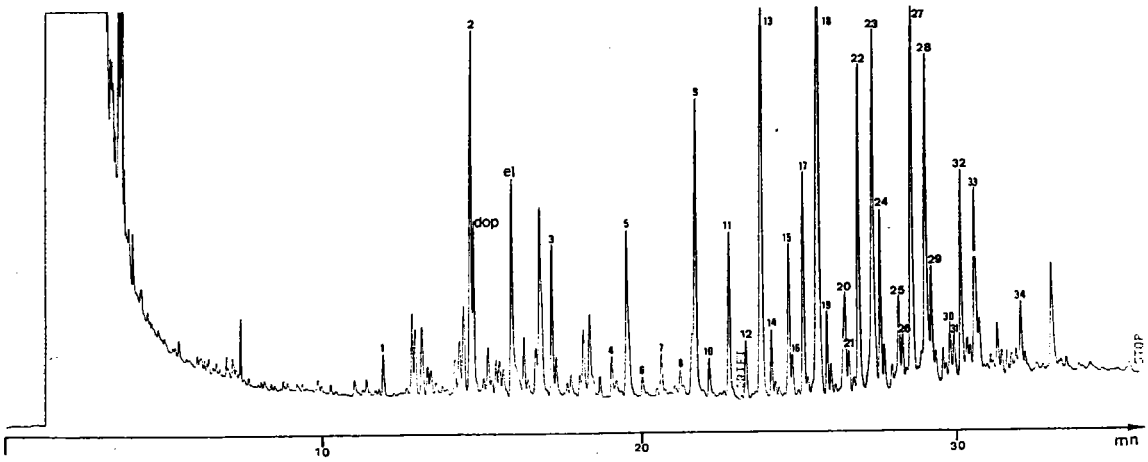


Fig. 34: Chromatogramme de la fraction acide L1a (anmoor de Lachaussée 10-20 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

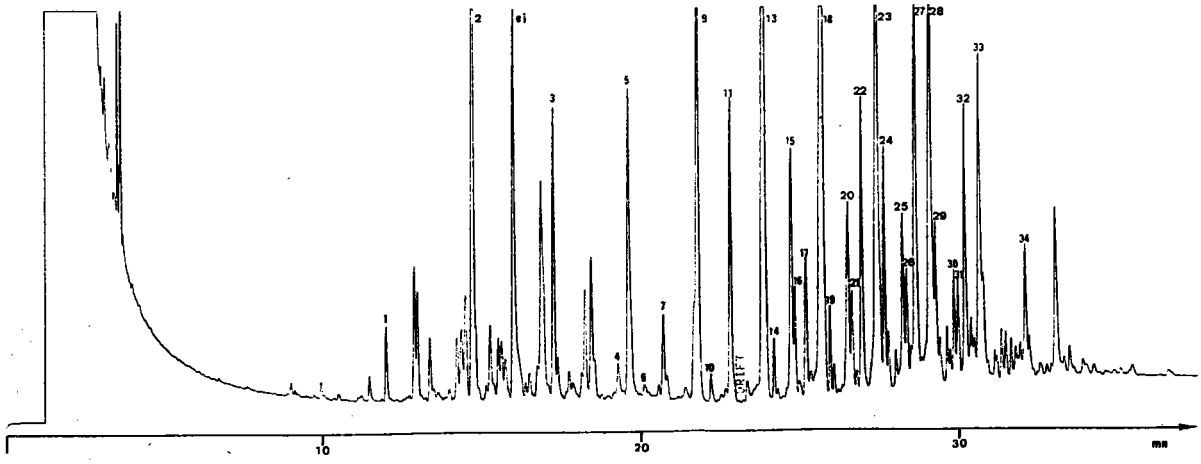


Fig. 35: Chromatogramme de la cire L1a, fraction A, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

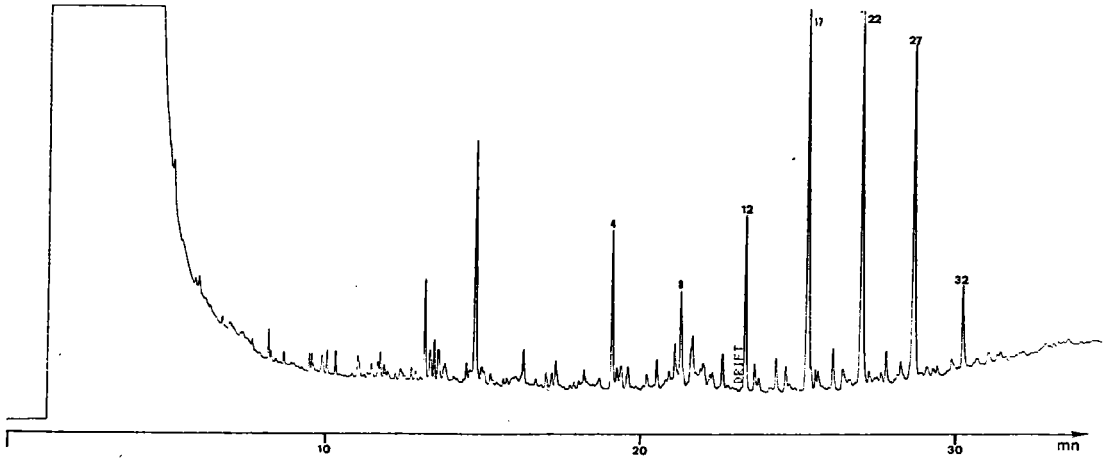


Fig. 36: Chromatogramme de la cire L1a, fraction B, sur colonne capillaire CP-Sil 5.

ei étalon interne:
acide heptadécanoïque (C17)
DEHP di-2-éthylhexyl phtalate*
DOP dioctyl phtalate*
1 acide tétradécanoïque (C14)
2 acide hexadécanoïque (C16)
3 acide octadécanoïque (C18)
4 acide hydroxy-16 hexadécanoïque (C16)
5 acide eicosanoïque (C20)
6 n-eicosanol (C20)
7 acide heneicosanoïque (C21)
8 acide hydroxy-18 octadécanoïque (C18)
9 acide docosanoïque (C22)
10 n-docosanol (C22)
11 acide tricosanoïque (C23)
12 acide hydroxy-20 eicosanoïque (C20)
13 acide tétracosanoïque (C24)
14 n-tétracosanol (C24)
15 acide pentacosanoïque (C25)
16 acide docosanedioïque (C22)
17 acide hydroxy-22 docosanoïque (C22)
18 acide hexacosanoïque (C26)
19 n-hexacosanol (C26)
20 acide heptacosanoïque (C27)
21 acide tétracosanedioïque (C24)
22 acide hydroxy-24 tétracosanoïque (C24)
23 acide octacosanoïque (C28)
24 n-octacosanol (C28)
25 acide nonacosanoïque (C29)
26 acide hexacosanedioïque (C26)
27 acide hydroxy-26 hexacosanoïque (C26)
28 acide triacontanoïque (C30)
29 n-triacontanol (C30)
30 acide hentriacontanoïque (C31)
31 acide octacosanedioïque (C28)
32 acide hydroxy-28 octacosanoïque (C28)
33 acide dotriacontanoïque (C32)
34 acide tétratriacontanoïque (C34)

TABLEAU XVI: Liste des composés identifiés dans les fractions acides L0a et L1a (fig. 33-36) (*contaminants).

α-ω diacides (fraction A) de C22 à C30 (voir fig. 33-36 et tableaux XVI-XVII). On remarque la fraction importante de substances non volatiles en CPV (plus de 60%). Rappelons que la fraction acide L0a ne constitue que 18% de l'échantillon L0 brut (voir tableau III p. 24) qui contient donc essentiellement des substances insaponifiables.

La composition de la fraction L1a (54% de la cire L1 brute) est comparable à celle des cires Fa et V1a.

Nombre d'atomes de C	Acides gras		Alcools gras		α -ω diacides		ω-hydroxy-acides	
	L0	L1	L0	L1	L0	L1	L0	L1
14	0,21	0,19						
15	0,09							
16	0,85	1,86					0,21	0,14
18	0,24	0,63			0,06		0,12	0,11
19	0,06						0,04	
20	0,29	0,95		0,07	0,19		0,14	0,21
21	0,06	0,20					0,04	0,05
22	0,43	1,46	0,19	0,12	0,16	0,18	0,39	0,80
23	0,10	0,74					0,05	0,08
24	0,61	2,55	0,10	0,18	0,23	0,17	0,92	1,19
25	0,16	0,72					0,07	0,10
26	0,78	2,88	0,08	0,20	0,39	0,24	1,57	1,78
27	0,14	0,60					0,04	0,05
28	0,77	1,97	0,36	0,45	0,20	0,19	0,55	0,70
29	0,17	0,42						
30	1,59	1,52	0,24	0,27		0,08		
31	0,12	0,20						
32	1,03	0,91	0,16					
33	0,05	0,10						
34	0,30	0,25	0,05					
36	0,06							
Total	8,1	18,1	1,2	1,3	1,2	0,9	4,1	5,2
Total identifiés	17,7	25,5						
Non identifiés	15,5	10,8						
Non volatils	66,8	63,7						

TABLEAU XVII: Analyse quantitative des fractions acides L0a et L1a (Lachaussée 0-10 cm et 10-20 cm) en % de l'échantillon injecté.

Signalons que l'échantillon L0 a été pollué à un certain stade du prélèvement (sacs en matière plastique?) ou de l'analyse par des phtalates qui sont des contaminants courants des échantillons biologiques. On reconnait aisément ces phtalates par leur spectre de masse caractérisé essentiellement par un pic de base à m/z = 149 (68).

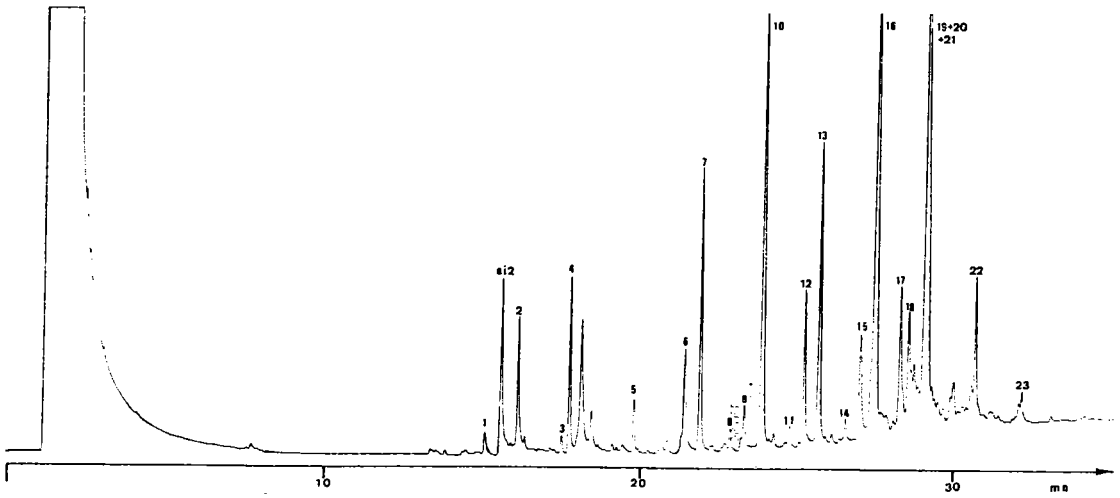


Fig. 37: Chromatogramme de la fraction insaponifiable L0i (Lachaussée 0-10 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

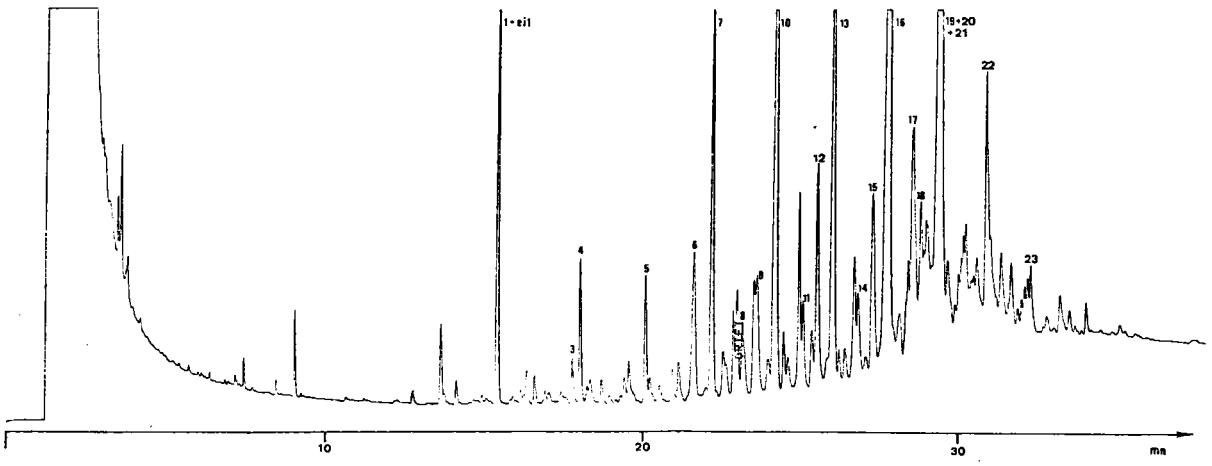


Fig. 38: Chromatogramme de la fraction insaponifiable L1i (Lachaussée 10-20 cm) sur colonne capillaire CP-Sil 5.

ei1: étalon interne 1 et
1 n-hexadécanol (C16)
ei2: étalon interne 2:
n-eicosane (C20)
2 acide hexadécanoïque TMSi ester (C16)
3 n-octadécanol (C18)
4 phytol
5 n-eicosanol (C20)
6 diéthyl-hexyl phtalate*
7 n-docosanol (C22)
8 n-tricosanol (C23)
9 n-heptacosane (C27)
10 n-tétracosanol (C24)
11 n-pentacosanol (C25)
12 n-nonacosane (C29)
13 n-hexacosanol (C26)
14 n-heptacosanol (C27)
15 n-hentriacontane (C31)
16 n-octacosanol (C28)
17 campestérol
18 stigmastérol
19 ß-sitostérol
20 ß-stigmastanol
21 n-triacontanol (C30)
22 n-dotriacontanol (C32)
23 n-tétratriacontanol (C34)

TABLEAU XVIII: Liste des composés identifiés dans les fractions insaponifiables L0i et L1i (fig. 37-38)(*contaminant).

Nombre d'atomes de C	Alcools gras		n-alcanes		Stérols		
	L0	L1	L0	L1	Nom	L0	L1
16	0,17	0,28			campestérol	0,98	1,57
18	0,19	0,19			stigmastérol	1,34	0,78
20	0,34	0,50			ß-sitostérol	3,20	2,35
21		0,18			ß-sitostanol	1,00	0,75
22	1,76	1,97					
23	0,06	0,43			total	6,5	5,5
24	3,74	3,76					
25	0,08	0,46			Autres:		
26	1,98	3,22			DEHP	1,00	0,30
27	0,16	0,42	0,23	0,30	acide C16		
28	4,88	6,82			(TMSi ester)	1,05	
29	0,15		1,17	1,24			
30	2,22	3,50					
31	0,33		0,83	1,14			
32	0,70	1,03					
34	0,18	0,20					
phytol	1,10	0,50					
Total	18,1	23,5	2,2	2,7		8,6	6,1
Total identifiés	28,9	32,3					
Non identifiés	10,7	13,1					
Non volatils	60,4	54,6					

TABLEAU XIX: Analyse quantitative des fractions insaponifiables L0i et L1i (Lachaussée 0-10 cm et 10-20 cm) en % de l'échantillon injecté.

b) Fractions insaponifiables L0i et L1i (fig. 33-36, tableaux XVIII et XIX).

Les résultats de ces analyses montrent que ces deux fractions ont des compositions très voisines et semblables à celle des cires de tourbes: n-alcanes de C27 à C31, alcools gras de C16 à C34, stérols (principalement le ß-sitostérol et le ß-stigmastanol) et une importante fraction non volatile en CPV (>50%).

Parmi les alcools nous avons également trouvé un composé (pic CPV n° 4, fig. 33) dont le spectre de masse est identique à celui du phytol (TMSi éther):

II-8-4 Comparaison des différents échantillons.

Dans les tableaux de résultats précédents nous avons donné les proportions des divers composés en % de l'échantillon injecté. En utilisant les données du tableau III (p 24) on peut exprimer ces résultats en % de la cire brute ou encore en mg/100 g de matière première sèche. Nous pensons que ces dernières valeurs ont peu d'intérêt, car les proportions de matières organiques sont différentes pour les divers échantillons (plus de 80% en général pour les tourbes, 30% pour un anmoor). Pour les comparer les valeurs exprimées en % de la cire brute nous semblent plus significatives. Dans le tableau XX nous donnons ces valeurs ainsi que les valeurs en mg/100 g par classe de substances identifiées.

Les points suivants se dégagent:

- Les acides gras représentent la classe la plus importante et au total leur proportion dans les cires brutes est à peu près équivalente dans les divers échantillons (9 à 17 %), sauf pour l'échantillon LO qui contient peu d'acides. Les acides gras à chaîne courte (C14-C20) sont moins abondants que les acides gras supérieurs (> C20), sauf dans l'échantillon de surface de la tourbe de Vitrimont.

- On trouve des ω-hydroxy-acides de C16 à C28 aussi bien dans les cires extraites de l'anmoor que dans les cires de tourbes, avec un maximum pour l'échantillon V1 (Vitrimont, prélevé à 80 cm de profondeur).

- Les α-ω diacides et les n-alcanes sont peu abondants (moins de 1,5% des cires brutes).

- La proportion d'alcools gras est la plus importante dans l'échantillon V1 et n'est supérieure à celle des acides gras que dans l'échantillon de surface de l'anmoor.

-Les stérols (campestérol, stigmastérol, β-sitostérol et β-stigmastanol) sont présents dans toutes les cires étudiées, leur proportion étant un peu plus faible dans les

Echantillon	F		V0		V1		L0		L1	
	%	(*)	%	(*)	%	(*)	%	(*)	%	(*)
Alcanes	0,4	10	0,5	2	1,4	4,5	1,4	2,5	0,9	1,5
Alcools gras	3,9	97	3,9	15	10,3	35	12,2	21	8,9	14
Acides gras C14 - C20	2,3	57	7,9	32	2,7	8,5	1,0	1,7	2,0	3
Acides gras > C20	9,6	240	1,5	6	14,3	46	1,1	2	7,8	12
ω-hydroxy-acides	4,2	105	2,7	11	11,4	36	0,7	1,2	2,8	4,5
α-ω diacides	0,4	10	0,3	1,2	1,4	4,5	0,2	0,3	0,5	0,15
Stérols	3,1	77	4,2	17	2,1	7	4,3	7,3	1,9	3
Autres substances	2,6	65	5,6	22	0,2	0,7	1,2	2	0,1	0,2
Non identifiés	5,6	140	14,0	56	10,5	34	9,9	17	10,4	17
Non volatils	52,9	1320	37,4	150	42,7	140	51,9	88	53,5	86
Pertes	15		22		3		16		11	

TABLEAU XX: Comparaison des analyses des diverses cires en % de la cire brute (* en mg /100 g de matière première sèche).

échantillons prélevés en profondeur, ce qui semblerait confirmer les résultats obtenus par BEL'KEVICH (54), mais contredire ceux de LUOMALA (57) qui n'a pas trouvé de corrélation entre le taux de stérols et la profondeur.

- Les triterpénoïdes identifiés sont très divers (inclus dans la rubrique autres composés dans le tableau XX). La friedeline semble être un triterpénoïde universel des tourbes, puisque nous en avons trouvé dans les deux échantillons de tourbe et que sa présence avait déjà été signalée dans une tourbe d'Israël (52). Il n'est pas exclu que les divers triterpénoïdes identifiés dans la tourbe "Floratorf" soient également présents, en plus faibles proportions, dans la tourbe de Vitrimont ou l'anmoor de Lachaussée, car nous n'avons pas enregistré systématiquement les spectres de masse

correspondant à tous les petits pics des différents chromatogrammes.

Par ailleurs la présence dans la tourbe "Floratorf" de triterpénoïdes de la famille du hopane (hopane en C31, épimère 17α-21β, et les acides et alcools en C32, épimères 17α-21β et 17β-21β) est probablement associée à la dégradation microbienne des plantes (59).

- Enfin dans tous les échantillons on note la présence d'une fraction importante de substances non volatiles en CPV (37-54%).

III- CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION (CLHP).

Nous avons également tenté de séparer les constituants des cires par CLHP dans l'espoir de pouvoir caractériser les substances non volatiles en CPV. Pour cela nous avons utilisé les trois techniques suivantes:

- chromatographie d'adsorption;
- chromatographie de partage en phase inverse;
- chromatographie par perméation de gel (ou d'exclusion) (CPG).

Les divers échantillons sont d'abord filtrés sur filtre en téflon "Fluoropore" (500 mμ) pour éliminer les particules solides en suspension dans la solution.

III-1 Matériel.

Nous disposons d'un chromatographe CLHP "WATERS M 6000 A". La détection est effectuée par réfractométrie différentielle (réfractomètre "WATERS R 401") ou par absorbance UV à 254 nm (détecteur par absorbance UV "WATERS M 440").

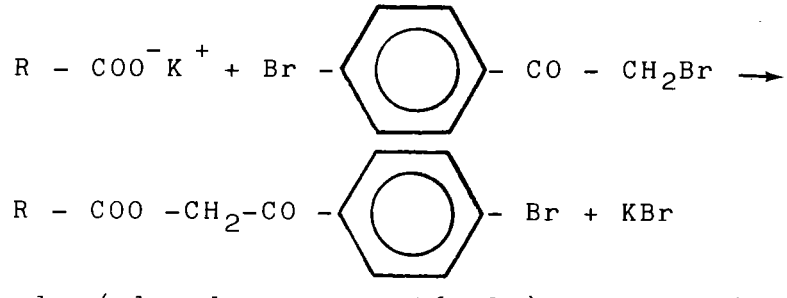
Colonnes:

- 2 colonnes μ-Porasil en série, longueur 30 cm, diamètre interne 4mm, pour la chromatographie d'adsorption;
- colonne μ-Bondapak C18, longueur 30 cm, diamètre interne 4 mm, pour la chromatographie de partage en phase inverse;
- colonnes μ-Styragel 500 Å et 100 Å en série, longueur 30 cm, diamètre interne 7,8 mm pour la CPG.

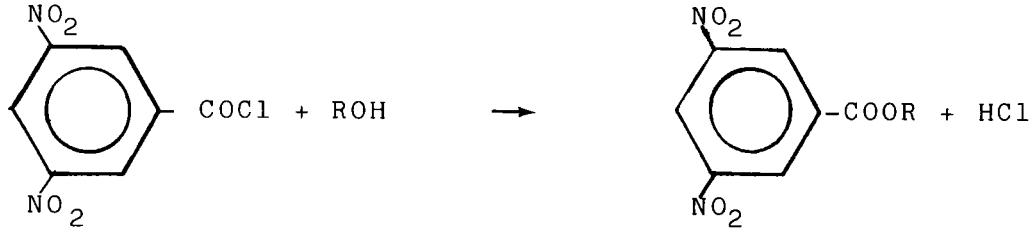
III-2 Dérivés pour la CLHP.

La réfractométrie différentielle est une méthode universelle de détection (non sélective), mais moins sensible que la détection par absorbance UV. Les acides gras, les alcools gras et la plupart des composés identifiés dans les tourbes n'absorbent pas en UV (aux longueurs d'onde supérieures à 200 nm). Il est donc nécessaire de les transformer en dérivés possédant cette propriété.

Les dérivés d'acides gras couramment utilisés sont des esters aromatiques: esters de benzyle, de phénacyle, de p-bromo-phénacyle, préparés selon la méthode de DURST (69) (voir annexe XI) employant comme catalyseur le dicyclo-hexyl-18-couronne-6-éther.



Les alcools (alcools gras, stérols) sont estérifiés d'après (70) par le chlorure de dinitro 3,5 benzoyle selon la réaction (voir annexe XI):



III- 3 Chromatographie d'adsorption.

Cette technique ne diffère pas fondamentalement de celle que nous avons utilisée pour le préfractionnement des cires. On peut par contre espérer de meilleures séparations grâce au pouvoir de résolution élevé des colonnes μ-Porasil (silice), mais les quantités injectées sont beaucoup plus faibles, la détection est donc effectuée par absorbance UV.

En opération isocratique l'éluant qui donne les meilleurs résultats est le système binaire tétrahydrofuranne-n-hexane. Ce dernier est un mauvais solvant de nos cires et sa force éluante est faible (le benzène est à exclure en raison de sa forte absorption en UV). Le THF permet la solubilisation des cires et leur élution. Une proportion trop importante de THF entraîne une élution trop rapide. Le mélange optimal est un mélange n-hexane-THF dans le rapport 1/6 (v/v) avec des débits de 2 ou 4 ml/mn.

Nous avons chromatographié sous forme d'esters de p-bromo-phénacyle les échantillons suivants:

- réactifs seuls (essai à blanc);
- réactifs + mélange d'acides gras témoins (C16-C28);
- réactifs + acide hydroxy-16 hexadécanoïque
- réactifs + fraction acide Fa.

La figure 39 nous montre le chromatogramme obtenu avec la cire Fa. Le pic 1 correspond aux acides gras qui sont tous élués ensemble. Les pics R correspondent aux réactifs. Le pic 6 a un volume de rétention identique à celui de l'acide hydroxy 16-hexadécanoïque. Nous pensons que les pics 2 à 6 correspondent aux ω-hydroxy-acides de C16 à C28, l'ordre d'élution étant dans l'ordre des longueurs de chaîne décroissantes. Nous avons injecté à dix reprises 10 µl de solution de cire Fa (environ 20 mg/ml dans le THF) et collecté les fractions 1 à 6. La réinjection de 10 µl des différentes fractions permet de tester la qualité des séparations. Celles-ci ne sont pas parfaites puisque les pics correspondant aux fractions sont imparfaitement résolus (surtout 2-4): par exemple la fraction 4 montre après réinjection un épaulement dû au composé 3. En fait ces composés sont bien mieux séparés après réinjection sur colonne µ-Bondapak C18, c'est-à-dire par chromatographie de partage en phase inverse, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. D'autre part nous avons confirmé l'ordre d'élution par chromatographie d'exclusion.

Dans les mêmes conditions opératoires, les dérivés du n-docosanol et du β-sitostérol (sous forme de dinitro 3,5 benzoates) sont élués en même temps. On n'obtient pas dans ces conditions de séparation des alcools gras et des stérols lorsqu'on chromatographie la fraction insaponifiable Fi.

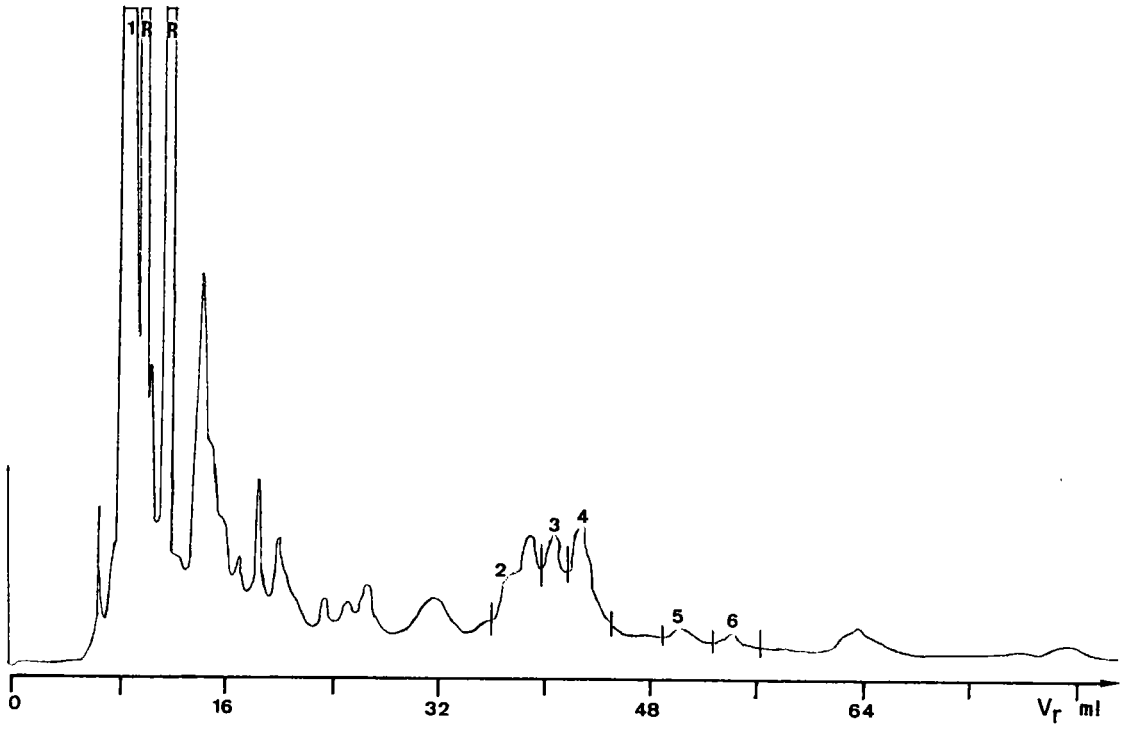


Fig. 39: Séparation de la cire Fa sur colonne µ-Porasil. Eluant THF-hexane 1-6, 4 ml/mn. R: réactifs; fraction 1: acides gras; fractions 2 à 6: ω-hydroxy-acides de C28 à C16.

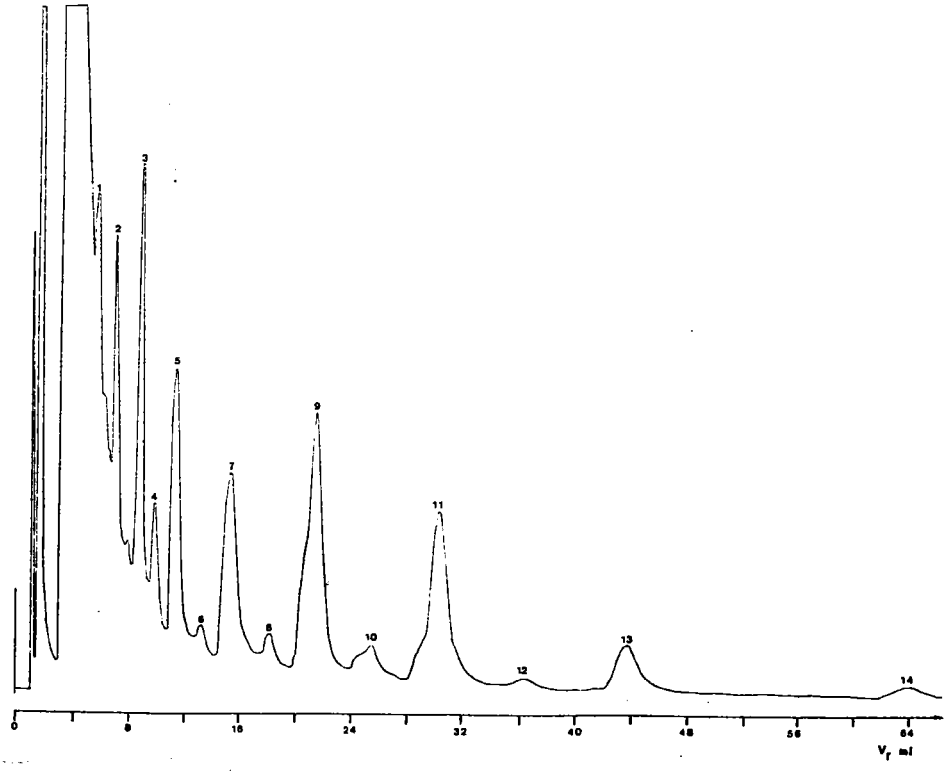


Fig. 40: Séparation de la cire Fa par chromatographie de partage sur colonne µ-Bondapak C18. Eluant: acétonitrile, 2 ml/mn. Acides gras: 1 (C16); 2 (C18); 3 (C20); 4 (C21); 5 (C22); 6 (C23); 7 (C24); 8 (C25); 9 (C26); 10 (C27); 11 (C28); 12 (C29); 13 (C30); 14 (C32).

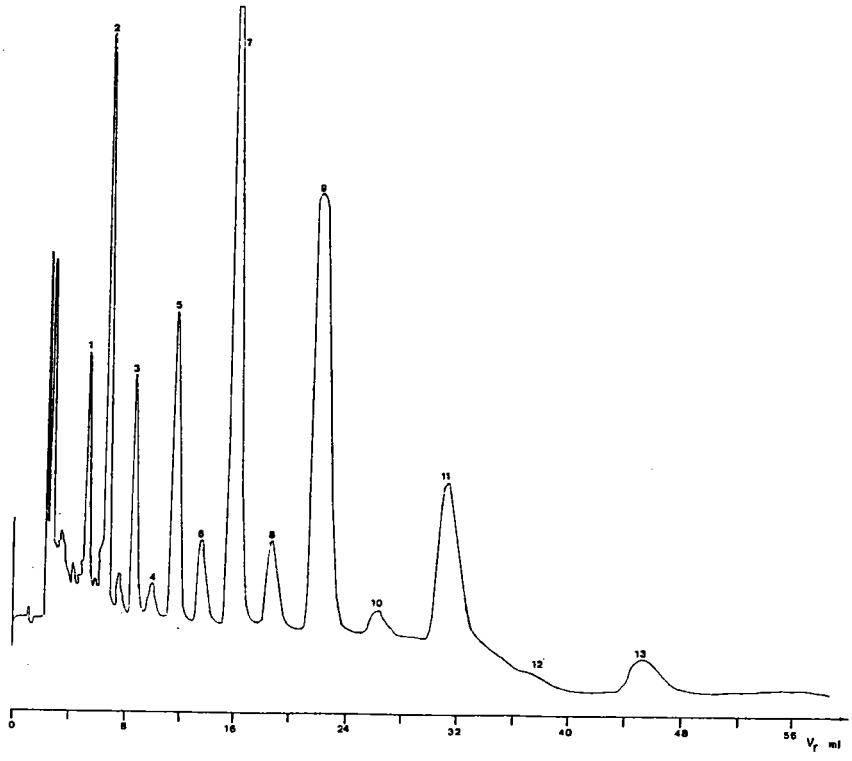


Fig. 41: Chromatographie de partage sur colonne µ-Bondapak C18 de la fraction 1 obtenue à partir de la cire Fa par chromatographie d'adsorption sur µ-Porasil. Eluant : acétonitrile, 2 ml/mn. Acides gras: 1 (C16); 2 (C18); 3 (C20); 4 (C21); 5 (C22); 6 (C23); 7 (C24); 8 (C25); 9 (C26); 10 (C27); 11 (C28); 12 (C29); 13 (C30).

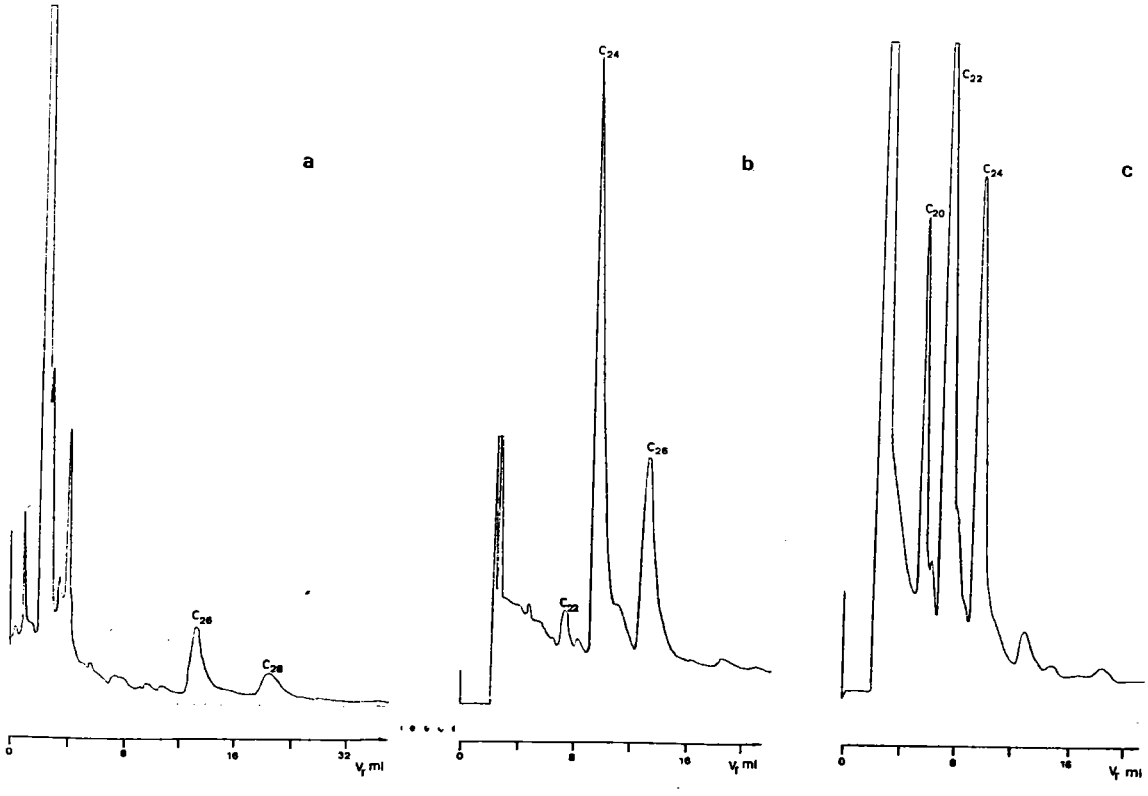


Fig. 42: Chromatographie de partage sur colonne µ-Bondapak C18 des fractions 2, 3 et 4 obtenues à partir de la cire Fa par chromatographie d'adsorption sur µ-Porasil. Eluant: acétonitrile, 2 ml/mn. a) fraction 2; b) fraction 3; c) fraction 4.

Nous avons également tenté d'effectuer des séparations avec des gradients d'élution divers avec le système n-hexane-THF, mais nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants.

III-4 Chromatographie de partage.

Les dérivés d'acides gras sont maintenant couramment analysés par chromatographie de partage en phase inverse sur des colonnes comme μ-Bondapak C18 (silice greffée) avec un gradient d'élution du système binaire acétonitrile-eau ou méthanol-eau. De cette façon on peut séparer les acides gras jusqu'au terme en C24. Au-delà les temps de rétention deviennent prohibitifs. Ceci concerne particulièrement nos échantillons dans lesquels on trouve couramment des composés de longueur de chaîne supérieure à 24 atomes de carbone. De plus, des problèmes liés à la solubilité des cires interdisent l'usage de l'eau. En utilisant l'acétonitrile seul à raison de 2 ml/mn nous obtenons l'élution de l'acide en C32 en environ 32 minutes, mais les acides rapidement élués sont masqués par le pic du solvant et des réactifs. La figure 40 nous montre la séparation obtenue avec la cire Fa. Les épaulements observés indiquent la présence d'autres composés accompagnant les acides gras. Les volumes de rétention des différents constituants sont identiques à ceux d'un mélange témoin d'acides gras de C16 à C28. De plus les volumes de rétention des différents acides suivent comme en CPV la loi:

$$\log (V_n - V_M)/(V_0 - V_M) = A.n + B$$

avec:

V_n: volume de rétention de l'acide à n atomes de carbone;

V_0: volume de rétention d'un composé de référence;

V_M: volume de rétention d'un composé non retenu sur la colonne (en pratique le solvant).

Nous avons injecté les différentes fractions obtenues sur colonne μ-Porasil. La figure 41 nous montre le chromatogramme de la fraction 1: on remarque la disparition des épaulements. Nous avons vérifié que les différents acides suivent bien la

loi ci-dessus.

Les composés des fractions 2 à 4 suivent également une loi de ce type, ce qui montre qu'ils appartiennent à une même famille de composés. Nous pensons qu'il s'agit des acides ω-hydroxylés de C20 à C28. La figure 42 montre les chromatogrammes de ces fractions sur colonne μ-Bondapak C18. La séparation obtenue sur colonne μ-Porasil est imparfaite: on remarque par exemple que le pic de l'hydroxy-acide en C24 est entouré de pics satellites correspondant aux hydroxy-acides en C22 et C26. Les hydroxy-acides sont en revanche nettement séparés par chromatographie de partage.

De ces considérations nous proposons la méthode suivante pour séparer les ω-hydroxy-acides: on effectue une première séparation sur colonnes μ-Porasil en collectant ensemble les fractions 2 à 6, c'est-à-dire les hydroxy-acides de C16 à C28. La séparation des différents termes est ensuite effectuée par chromatographie de partage. Moyennant une adaptation de cette méthode à un stade préparatif, la tourbe pourrait servir de matière première à la production de produits chimiques purs, en particulier d'ω-hydroxy-acides de C16 à C28.

III-5 Chromatographie par perméation de gel (CPG).

Nous avons vu qu'une fraction importante des cires est insuffisammment volatile en CPV même après méthylation et silylation. D'autre part le préfractionnement sur colonne de gel de silice de la cire Fa méthylée nous a donné des fractions (A à F) dont les masses molaires moyennes déterminées par tonométrie s'échelonnent de 420 à 1300. Afin d'avoir une idée plus exacte de la répartition des masses molaires, nous avons entrepris une étude par CPG, technique également utilisable pour la séparation par taille de petites molécules (masse molaire <2000) (71, 72).

III-5-1 Etalonnage des colonnes.

Pour étalonner le jeu de colonnes choisi, nous avons chromatographié des n-alcanes de C17 à C40, des esters méthyliques d'acides gras de C15 à C30 ainsi que des

triglycérides. Simultanément, avec chaque composé étudié, on a injecté un polystyrène standard de masse molaire 110 000 qui définit la limite d'exclusion V_0 du jeu de colonnes utilisé.

Les courbes d'étalonnage $\log n = f(V - V_0)$, où n est le nombre total d'atomes de carbone du composé chromatographié, sont représentées par les figures 43a et 43b, avec comme éluants respectivement le benzène et le THF. Dans les deux cas, les courbes correspondant aux hydrocarbures et aux esters méthyliques sont pratiquement confondues. La courbe représentative des triglycérides se situe légèrement au-dessus des précédentes, c'est-à-dire qu'ils apparaissent un peu plus petits que les n-alcanes ou les esters méthyliques ayant même nombre d'atomes de carbone.

En CPG, c'est la taille et non la masse molaire qui intervient dans le mécanisme de séparation. Ceci prend une importance toute particulière avec des molécules comprenant des groupements polaires, comme OH et COOH (72). Ces molécules se comportent de façon opposée suivant la polarité de l'éluant utilisé. Avec le benzène comme éluant, des phénomènes d'adsorption se superposent au mécanisme d'exclusion pure. Cet effet est le plus sensible avec les molécules les plus polaires. Ainsi l'octadécanol (C18) sort comme l'hexadécane (C16).

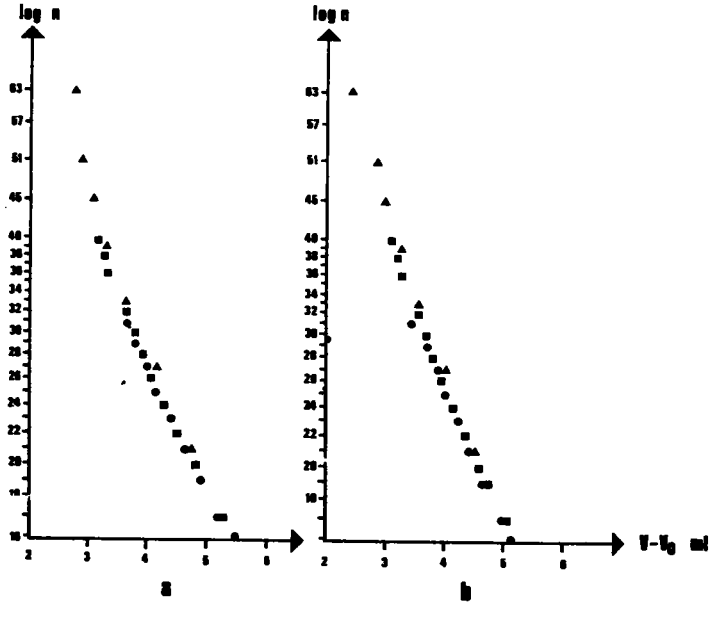


Fig. 43: Courbes d'étalonnage des colonnes μ-Styragel en fonction de la longueur de chaîne: ■, n-alcanes; ●, esters méthyliques; ▲, triglycérides. Eluants: a) benzène; b) THF.

L'utilisation du benzène pour chromatographier les acides gras libres est à déconseiller car les phénomènes d'adsorption se traduisent par des pics très retardés, larges et asymétriques. Lorsqu'on utilise au contraire un solvant polaire comme le THF, les phénomènes d'adsorption disparaissent, mais des liaisons hydrogène s'établissent entre les atomes d'hydrogène des groupements polaires et le solvant, ce qui a pour effet d'augmenter la taille des molécules: la taille apparente de l'octadécanol est celle d'un hydrocarbure en C21 et l'acide stéarique apparait comme l'hydrocarbure en C22. Néanmoins, lorsque la longueur de la chaîne augmente, l'influence de ces liaisons diminue: la longueur de chaîne apparente de l'acide tétracosanoïque (n = 24) est de 26,5. D'autre part, l'étude de divers diglycérides montre qu'au delà de n = 30, les différences introduites par la présence d'hydroxyles deviennent peu sensibles et sont du même ordre de grandeur que les incertitudes expérimentales.

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

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

III-5-2 Résultats.

La figure 44a représente le chromatogramme de la fraction acide Fa (éluant THF). On distingue un pic large A dont le sommet correspond à une longueur de chaîne équivalente de n = 55-75 et un massif B correspondant à des molécules plus petites: n = 15-34. Le chromatogramme obtenu après méthylation des carboxyles se traduit par une petite diminution de n équivalent de 2-3 unités pour les pics du massif B (disparition des associations entre les carboxyles et le solvant). Par contre on n'observe pas de variation significative du volume d'élution de A en raison de la taille plus importante des

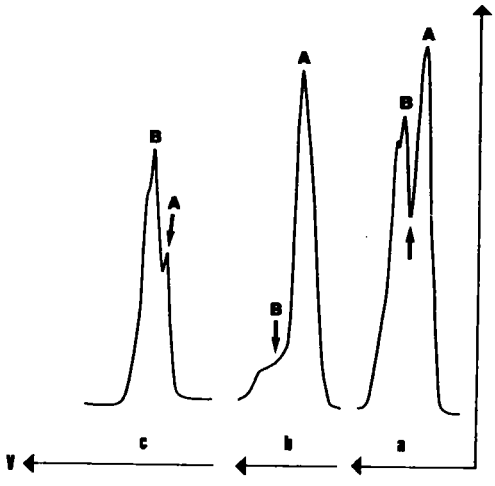


Fig. 44: Séparation de la fraction acide Fa par CPG a) mélange initial; b) fraction A après séparation de B; c) fraction B après trois séparations.

Nombre de séparations	Fraction (%) A	B
1	30,3	69,7
2	36,7	63,3
3	39,5	60,5

TABLEAU XXI: Proportions des fractions A et B en masse après chacune des trois séparations.

molécules. Avec le benzène comme éluant, le chromatogramme de la fraction acide Fa méthylée révèle les mêmes pics A et B dont les longueurs de chaîne équivalentes correspondent aux précédentes. Il résulte de cette étude que la fraction acide Fa contient des composés de deux tailles différentes: un premier groupe de molécules relativement petites dont la longueur de chaîne varie de 15 à 34 et un deuxième groupe de molécules approximativement de longueur double (n = 55-75). L'étude par CPG des différentes fractions que nous avons séparées précédemment par préfractionnement sur colonne de gel de silice montre qu'on a affaire en réalité à des mélanges de composés de tailles A et B. Il en est de même pour la fraction insaponifiable Fi.

La figure 44a montre que les pics A et B sont partiellement résolus. Un deuxième passage de ces composés sur les colonnes par recyclage des composés élués se traduit par un élargissement des pics sans amélioration appréciable de la séparation. Les recyclages supplémentaires accroissent cet élargissement et il en résulte que la séparation en ligne de base n'est pas possible de cette façon. Nous avons préféré collecter les produits A et B, puis les rechromatographier. La flèche sur la figure 44a indique la fin de la collecte de A et le début de celle de B. La fraction A ainsi obtenue est

pratiquement exempte de B (fig. 44b), par contre la fraction B contient encore des molécules de type A. Une deuxième, puis une troisième chromatographie de B permettent d'améliorer cette séparation (fig. 44c). On obtient de cette façon des fractions pratiquement séparées. Le tableau XXI donne leurs proportions en masse après chacune des trois séparations.

Par chromatographie d'exclusion, nous avons donc déterminé dans la fraction acide Fa de la tourbe "Floratorf" deux tailles de composés: A (masse molaire 800-1100) et B (masse molaire 250-500) dont les proportions respectives sont d'environ 40% et 60%. Dans la fraction B on retrouve les acides gras normaux et les hydroxy-acides que nous avons identifiés par CPV et spectrométrie de masse (n = 16-34). Les substances volatiles en CPV représentant 35% du produit initial, il semble rester dans la fraction B 25% de composés relativement petits (n<35), mais pourtant difficiles à mettre en évidence par CPV. Néanmoins on doit accueillir ces chiffres avec prudence, car nous avons rencontré des problèmes de colmatage à l'entrée des colonnes, bien que les échantillons aient été filtrés au préalable sur filtre en téflon, avec pour conséquence une forte augmentation de pression. Cette augmentation a provoqué des fuites au niveau de l'injecteur, d'où des pertes d'échantillon que nous avons essayé de limiter au maximum en collectant les gouttes résultant des fuites.

Enfin par cette méthode nous avons également étudié les fractions 2 à 6 obtenues sur colonne μ-Porasil. Les volumes de rétention augmentent pour les fractions 2 à 6, ce qui montre bien que la taille des molécules diminue dans cet ordre. Les autres fractions éluées sur colonne μ-Porasil sont constituées également de substances de taille B que nous n'avons pas caractérisées.

IV CONCLUSION.

En conclusion de ce chapitre, la CLHP nous a donné moins de résultats que la CPV-capillaire. Néanmoins elle a

l'avantage de pouvoir être appliquée à un stade préparatif. De plus la CPG nous a fourni de précieux renseignements sur la taille des molécules.

La CPV-capillaire précédée d'un préfractionnement sur colonne d'alumine, nous a permis de séparer et d'évaluer les proportions d'une grande variété de substances: acides et diacides gras, ω-hydroxy-acides, n-alcanes, alcools gras, stérols et triterpénoïdes. Comme il n'est pas possible de disposer d'une collection complète de composés de référence, l'identification des différents composés est facilitée par l'emploi de la technique de couplage CPV-spectrométrie de masse (voir chap. V).

C H A P I T R E IV

CHAPITRE IV

TENTATIVES DE DEGRADATION DES CIRES.

Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique ont montré que les différents échantillons contiennent une fraction importante de substances non volatiles en CPV de masse molaire 800-1100. Nous avons soumis la fraction acide Fa 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- REACTIONS DE COUPURE DE DOUBLES LIAISONS.

L'analyse par CPV n'a pas permis d'identifier des acides gras insaturés de longueur de chaîne inférieure à 36 atomes de carbone. Cependant l'indice d'iode et le spectre IR de la cire Fa (fig. 5) semblent indiquer la présence de composés insaturés, peut-être de masse molaire plus élevée (1,6 à 2,9 doubles liaisons pour 1000 g de cire). Nous avons cherché à attaquer ces composés au niveau des doubles liaisons éthyléniques.

I-1 Ozonolyse.

L'action de l'ozone sur les composés éthyléniques, suivie d'une hydrolyse de l'ozonide en présence de H_2O_2, conduit, par coupure au niveau de la double liaison, à la formation de deux acides carboxyliques.

L'ozonisation d'une double liaison est effectuée dans des conditions optimales, lorsqu'on opère à basse température (-65 °C), avec une solution d'ozone dans le n-pentane (73). Nous avons essayé de nous rapprocher de ces conditions, malgré

la faible solubilité de nos cires dans le n-pentane (voir partie expérimentale en fin de ce chapitre).

La fraction acide Fa 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. D'ailleurs la masse molaire des produits d'ozonolyse reste élevée (645). Ceci montre que la coupure obtenue n'est que partielle.

I-2 Action d'un periodate en présence de $KMnO_4$.

L'action d'un periodate en présence de $KMnO_4$ servant de catalyseur, donne naissance à deux acides carboxyliques suivant la réaction globale:

$$R - CH = CH - R' + 4\ IO_4^- + MnO_4^- \longrightarrow$$
$$R - COOH + R' - COOH + 4\ IO_3^- + MnO_4^-$$

Le permanganate réagissant sur la double liaison est régénéré par l'action des ions IO_4^- .

Le mode opératoire est voisin de celui préconisé par VON RUDLOFF (74) (voir partie expérimentale).

La décoloration ainsi obtenue n'est que partielle. Comme après ozonolyse la masse molaire moyenne (490) ne diminue pas sensiblement et l'analyse par CPV des dérivés méthylés ne fournit pas de renseignements supplémentaires.

I-3 Hydroxylation par l'acide peracétique.

L'action d'un peracide sur une double liaison conduit à la formation d'un époxyde donnant naissance après hydrolyse à un dérivé dihydroxylé:

$$R - CH = CH - R' \xrightarrow{R - CO_3H} R - \underset{\diagdown O \diagup}{CH - CH} - R' \xrightarrow{H_2O}$$
$$R - CHOH - CHOH - R'$$

La coupure du diol formé par l'ion periodate fournit des aldéhydes ou des cétones aisément détectables par CPV:

$$R - CHOH - CHOH - R' \xrightarrow{IO_4^-} R- CHO + R' - CHO$$

Le mode opératoire (voir partie expérimentale) est adapté d'après (75).

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

I-4 Oxydation par NaOCl catalysée par $RuCl_3$.

L'agent oxydant effectif est RuO_4 qui est régénéré des degrés d'oxydation inférieurs par l'hypochlorite. Cette méthode doit également permettre la coupure des doubles liaisons (76), mais elle a, comme les précédentes, donné des résultats négatifs.

II REACTIONS DE COUPURE DE LIAISONS ETHERS.

II-1 Utilisation du tétroxyde de ruthénium.

En dehors des réactions de coupure de doubles liaisons, le tétroxyde de ruthénium permet d'oxyder les alcools en acides et les éthers en esters. Ainsi le dibutyle éther est-il transformé en butyrate de butyle (77). Nous avons essayé cette réaction sur la fraction acide Fa. L'oxydation est suivie d'une saponification des esters éventuellement obtenus, puis d'une méthylation. L'analyse des produits obtenus par CPV n'a pas permis de mettre en évidence de résultats nouveaux.

II-2 Action de l'iodo-triméthylsilane.

L'iodo-triméthylsilane $(CH_3)_3SiI$ (TMSiI) permet de couper les fonctions éthers et esters (78,79), alors que les alcools sont transformés en dérivés iodés selon les réactions (80):

$$R - O - R' + TMSiI \longrightarrow \underbrace{R - OTMSi + R' - OTMSi}_{\downarrow H_2O \;\; R - OH + R' - OH + TMSiOH} + RI + R'I$$

$$R - COOR' + TMSiI \longrightarrow \underbrace{R - COOTMSi}_{\downarrow H_2O \;\; R - COOH + TMSiOH} + R'I$$

$$R\text{-}OH + TMSiI \longrightarrow RI + TMSiOH$$

Les temps de réaction sont variables suivant la température, de 2 heures à 100 °C à 120 heures à 25 °C. La méthode a été appliquée essentiellement à des éthers aryles-alkyles où le groupement alkyle est petit (méthyle, éthyle, isopropyle, ter-butyle). C'est ce groupement qui fixe l'atome d'iode (79).

Nous avons testé la méthode sur un éther à groupement alkyle important, le dihexadécyl 1,2 glycérol traité pendant 12 heures à 80 °C par TMSiI. On peut s'attendre à la formation d'hexadécanol $CH_3 - (CH_2)_{15} - OH$ dans les produits d'hydrolyse. Par CPV nous avons effectivement constaté la libération de cet alcool gras, mais nous n'avons pas déterminé le rendement de la réaction. Les éthers TMSi des alcools formés au cours de la réaction peuvent d'ailleurs donner avec un excès de TMSiI les dérivés iodés (79):

$$R - OTMSi + TMSiI \longrightarrow RI + (TMSi)_2O$$

On peut détecter les dérivés iodés en les réduisant en hydrocarbures par $LiAlH_4$ ou $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$.

Lorsqu'on traite par TMSiI la cire Fa réduite au préalable par l'un des réducteurs ci-dessus, on peut s'attendre aux phénomènes suivants:

- transformation d'alcools gras en dérivés iodés;
- coupure d'éventuelles fonctions éthers donnant lieu à la formation de dérivés iodés et d'alcools (éthers TMSi);
- après hydrolyse des produits de réaction et nouvelle réduction par l'hydrure, formation de n-alcanes ou d'autres hydrocarbures.

L'analyse par CPV des produits de réaction (traitement par

TMSiI, hydrolyse, réduction) permet effectivement de constater la présence d'alcools gras et de n-alcanes. Le tableau XXII montre les variations des proportions du n-tétracosane et du n-tétracosanol, relatives à celle du n-tétracosanol dans l'échantillon non traité, et mesurées par les variations des hauteurs des pics chromatographiques correspondants en fonction du temps de réaction (température de 80 °C).

temps (heures)	n-alcane C24	alcool C24	total
0	0	1	1
24	0,3	0,6	0,9
48	0,4	0,7	1,1
72	0,8	0,3	1,1
96	0,3	0,3	0,6
144	0,2	0,3	0,5

TABLEAU XXII: Réaction de l'iodo-triméthylsilane avec la cire Far: variations des proportions du n-tétracosane et du n-tétracosanol en fonction du temps de réaction.

On constate une diminution de la hauteur du pic du tétracosanol et une augmentation de la hauteur du pic du tétracosane dans les 72 premières heures de réaction. La somme des deux hauteurs reste voisine de l'unité. Au delà de 72 heures cette somme diminue, probablement en raison de pertes. Ces résultats montrent qu'au cours de la réaction une certaine fraction des alcools gras est transformée en dérivés iodés, mais qu'il ne semble pas y avoir production supplémentaire d'alcools gras ou de dérivés iodés par coupure de liaisons éthers.

III HYDROGENOLYSE DE DERIVES IODES.

Nous venons de voir que les alcools gras sont partiellement transformés en n-alcanes par traitement par TMSiI suivi d'une réduction par un hydrure. D'après (81) les alcools peuvent être transformés en hydrocarbures, avec un rendement de 80% à 90%, par traitement à 100 °C par l'iode en présence de phosphore rouge à l'abri de l'humidité. Cette méthode devrait

permettre de déterminer le squelette carboné des substances contenues dans les cires.

Nous avons identifié dans les produits de réaction des n-alcanes de C16 à C34 sans pouvoir mettre en évidence d'hydrocarbures plus lourds. De plus la présence d'alcools gras résiduels en proportions plus importantes que les n-alcanes est l'indice d'un rendement faible de la transformation alcool-alcane. Au total le taux de substances éluées reste inférieur à 40%.

Les résultats obtenus ne sont pas meilleurs avec les dérivés chlorés, préparés par action de $SOCl_2$, ou bromés (action de HBr) ou tosylés (réaction avec le chlorure de p-toluène-sulfonyle).

IV METHODE DE BERTHELOT.

La méthode dite "universelle" de Berthelot (82) permet, en principe, de réaliser l'hydrogénation totale d'un composé par traitement par l'acide iodhydrique concentré en tube scellé à 240 °C, et par conséquent de réduire les constituants des cires en hydrocarbures en une seule étape (voir partie expérimentale).

L'analyse par CPV d'un échantillon de cire brute Fb réduite selon cette méthode permet de mettre en évidence des n-alcanes de C16 à C34, par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux de n-alcanes de référence et également par couplage CPV-SM.

En utilisant le n-heptadécane comme étalon interne, nous avons déterminé que, dans les cas les plus favorables, le taux de n-alcanes élués est de l'ordre de 40% de l'échantillon injecté. La répartition de ces n-alcanes en fonction de la longueur de chaîne est semblable à celle des acides gras.

Afin de controler le rendement des réductions effectuées, nous avons méthylé les divers échantillons de cire traités par HI. L'analyse par CPV des cires ainsi réduites et méthylées permet de déceler, à côté des n-alcanes résultant de l'action de HI, des acides gras non réduits.

L'étude 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.

Nous avons également traité par HI l'éluat B (45% de la fraction acide Fa) obtenu par préfractionnement sur gel de silice. La réduction par HI produit des n-alcanes de C18 à C34 de répartition analogue à celle des acides gras (environ 8% de l'échantillon de départ Fa). Cette proportion correspond à celle des hydroxy-acides identifiés dans l'échantillon (6,4%).

Afin d'éliminer la difficulté d'obtenir la réduction totale des acides gras par HI, nous avons effectué la réduction préalable des groupements COOH en fonction alcool avant attaque iodhydrique. Les résultats de l'analyse chromatographique montrent que les n-alcanes de C16 à C34 obtenus constituent, comme précédemment, 40% de l'échantillon injecté.

V CONCLUSION.

Les diverses tentatives de dégradation de la cire Fa, qui devraient conduire à l'apparition de substances de plus faibles masses molaires, n'ont permis de caractériser aucune substance nouvelle par CPV: la répartition et le pourcentage des esters méthyliques élués (environ 30% 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 periodique (490) indique la présence de substances de masses molaires élevées (celle de l'acide en C26 est de 396).

Il ne semble donc pas qu'il ait eu production de composés de plus faibles masses molaires. Cela pourrait provenir de l'ouverture partielle des doubles liaisons ou de l'ouverture de doubles liaisons à l'intérieur de structures cycliques (ou de liaisons C-O dans le cas de l'attaque par TMSiI). Il est possible également que la décoloration obtenue lors des réactions d'oxydation provienne de réactions secondaires ne donnant pas lieu à des réactions de coupure. Signalons d'ailleurs que les substances décolorées se recolorent facilement sous l'action de la chaleur à partir de 80 °C.

Les méthodes d'hydrolyse ont montré qu'environ 40% des substances de la fraction acide Fa ont une longueur de chaîne comprise entre 16 et 34 atomes de carbone, ce qui correspond à la proportion des substances volatiles déterminée par CPV au chapitre précédent (en particulier les acides gras et les hydroxy-acides). Les substances non volatiles en CPV possèdent donc probablement des chaînes carbonées très longues avec peut-être quelques ramifications (de l'ordre de C50-C60), non susceptibles de dégradation par coupure de doubles liaisons ou de fonctions éthers.

VI PARTIE EXPERIMENTALE.

VI-1 Ozonolyse.

On obtient une solution d'ozone en faisant barboter de l'oxygène ozonisé dans du n-pentane refroidi à -40 °C à l'aide d'un bain de chlorodifluorométhane. D'autre part une solution de 100 mg de cire Fa dans le minimum de chloroforme est également refroidie à -40 °C, puis versée dans la solution d'ozone. Le contact est maintenu pendant quelques minutes. Du fait de la précipitation partielle 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 l'échantillon. Lorsque la décoloration est effective, les ozonides formés sont détruits en les traitant par de l'eau bouillante en présence de H_2O_2.

VI-2 Action d'un periodate en présence de $KMnO_4$.

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 détruit par un excès de pyrosulfite de sodium. Après acidification, les produits de l'oxydation sont extraits à l'éther.

VI-3 Hydroxylation par l'acide peracétique.

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 d'hydrogénosulfite de sodium, 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.

VI-4 Méthode de Berthelot.

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. La cire ainsi traitée est extraite au benzène. La phase benzénique est lavée avec 10 ml d'une solution de $Na_2S_2O_3$ à 5% pour éliminer l'iode, puis avec de l'eau.

B.U. METZ

C H A P I T R E V

CHAPITRE V

SPECTROMETRIE DE MASSE.

I GENERALITES.

La technique de couplage chromatographie en phase vapeur-spectrométrie de masse (CPV-SM) est une technique d'analyse très puissante qui permet d'enregistrer le spectre de masse d'un composé émergeant du système chromatographique. Le spectre est pris généralement au sommet du pic chromatographique. Les systèmes informatisés modernes ont des possibilités accrues, comme par exemple le calcul de la différence de deux spectres de masse, en particulier la soustraction du bruit de fond.

La spectrométrie de masse permet dans de nombreux cas de déterminer la stucture d'un composé ou de confirmer cette structure établie par d'autres voies.

Elle nous a permis de vérifier la structure linéaire des acides gras ou de proposer une structure pour les divers composés inconnus élués au cours des analyses chromatographiques.

On peut également introduire l'échantillon directement dans le spectromètre de masse sans passer par un système chromatographique (introduction directe). Cette méthode est surtout applicable aux composés purs, les spectres de masse de mélanges sont très difficiles à exploiter.

En spectrométrie de masse usuelle l'ionisation des molécules est effectuée par bombardement électronique. Généralement l'énergie des électrons est de 70 eV. Dans certains cas, pour favoriser la production d'ions de masse élevée, en particulier de l'ion moléculaire $M^{+\cdot}$, (donc de limiter le nombre de fragments) on opère à basse énergie (9 à 20 eV).

L'ionisation des molécules peut être obtenue par des voies différentes:

- Par un champ électrique (désorption de champ). Cette technique permet l'étude de substances de masse molaire élévée. L'appareillage correspondant n'était pas disponible dans la région.

- Ionisation chimique: le bombardement ionique provoque l'ionisation d'un gaz réactant, par exemple le méthane, introduit dans le spectromètre de masse sous une pression de 0,1 torr. Il se forme des ions CH_5^+ qui réagissent avec les molécules de l'échantillon étudié, en donnant des ions quasi-moléculaires et peu de fragments:

$$M + CH_5^+ \rightarrow MH^+ + CH_4$$

Cette technique permet donc de déterminer les masses molaires et cela plus efficacement que par les spectres obtenus par ionisation électronique même à basse énergie.

II CONDITIONS EXPERIMENTALES.

Tous nos spectres ont été enregistrés pour une énergie des électrons de 70 eV. Les spectres des acides gras obtenus par couplage CPV-SM et ceux obtenus par introduction directe ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre "LKB" précédé d'une colonne remplie OV-1 (phase stationnaire apolaire) au service de spectrométrie de masse de la Faculté des sciences de Strasbourg.

Les spectres de masse des hydroxy-acides et des diols correspondants ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre "LKB 2091", équipé d'une colonne remplie OV-1, au service commun de spectrométrie de masse de l'Université de Nancy I.

Les spectres des alcools gras, des stérols, des triterpénoïdes (échantillons F, V et L) et des hydroxy-acides (échantillons V et L) ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre "NERMAG R 1010 C" avec informatique "SIDAR 111 B" au service commun de spectrométrie de masse de l'Université de Nancy I. La colonne est une colonne capillaire SE-30, de longueur 25 m, équivalente à notre colonne CP-Sil 5.

Les spectres par introduction directe et ionisation chimique ont également été obtenus sur cet appareil. La pression de méthane dans la source est de 0,1 torr. L'échantillon est désorbé thermiquement avec une intensité de chauffage de 30 mA à 530 mA à raison de 7 mA/s.

III IDENTIFICATION D'ACIDES ET DE DIACIDES GRAS.

III-1 Fragmentation des esters méthyliques d'acides et de diacides gras.

Les spectres de masse des esters méthyliques à longue chaîne sont bien connus depuis les travaux de RYHAGE et coll. (83).

Les pics les plus importants dans le spectre de masse (70 eV) des esters méthyliques d'acides gras saturés linéaires sont dus à des ions contenant de l'oxygène (83,84):

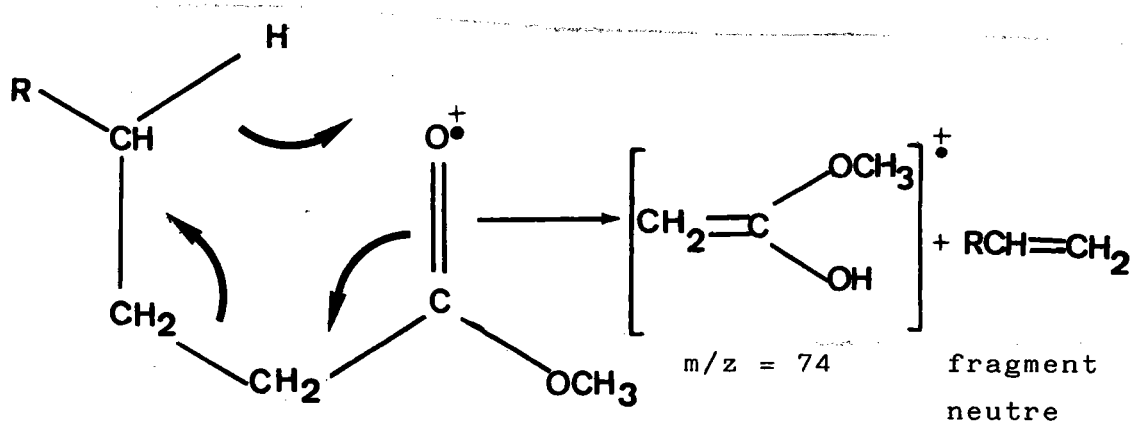
$$\left[CH_3\,O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - (CH_2)_n\right]^+$$

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

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

les deux derniers provenant de la perte de $(CH_2)_3$ + H et de $(CH_2)_2$ + H respectivement.

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



Les autres ions importants sont:

- l'ion moléculaire à m/z = M;
- l'ion à m/z = M-31 correspondant à la perte du méthoxyle $\left[\underset{\underset{O}{\|}}{C} - (CH_2)_n - CH_3\right]^+$;
- les ions correspondant à des fragments alkyles CnH2n+1 et CnH2n-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 coll. (83, 85, 86). La présence du substituant méthyle produit dans la plupart des cas un effet prononcé sur le spectre de masse. L'ion moléculaire

$$\left[CH_3 - O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - (CH_2)_n - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH} - (CH_2)_m - CH_3\right]^{+\cdot}$$

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

$$\left[CH_3 - O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - (CH_2)_n\right]^+ \quad \text{et} \quad \left[CH_3 - O - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - (CH_2)_n - \underset{\underset{CH_3}{|}}{CH}\right]^+$$

m/z = 59 + 14n m/z = 59 + 14n + 28

qui diffèrent de 28 unités de masse. Le pic de l'ion méthoxycarbonyle intermédiaire m/z = 59 + 14n + 14, qui diffère de 14 unités de masse des deux ions précédents, est très peu intense, sauf pour les esters du type antéiso, pour lesquels les pics à m/z = M-57 et m/z = M-29, quoique importants, sont moins intenses que le pic à m/z = M-43. Les esters antéiso se distinguent également des esters normaux par un pic à m/z = M-29 plus intense que le pic à m/z = 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/z = M-65 indique la présence d'un groupement isopropyle.

Pour les esters diméthyliques de diacides gras le pic de base est à m/z = 98. L'ion moléculaire est très peu abondant, mais on rencontre dans le domaine des masses élevées des pics faibles mais caractéristiques à m/z = M-31, M-64, M-73, M-92, M-105 et M-106 (87).

III-2 Identification d'acides gras dans la fraction acide Fa.

Les spectres (70 eV) obtenus par couplage CPV-SM dans les conditions précisées au § II sont reproduits en diagramme linéaire (fig. 46 à 56 en fin de ce chapitre). 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/z = 74.

On trouve également les ions de la série m/z = 59 + 14n, en particulier à m/z = 87, 143, M-43, M-29 et les ions à m/z = M, m/z = M-31. Ces acides ne comportent pas dans la chaîne de carbone substitué 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/z = 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 (84), sous réserve qu'il n'y ait pas de dégradation thermique de l'échantillon.

Nous avons comparé les spectres de masse des esters méthyliques de la cire Fa avec les spectres d'échantillons purs obtenus par RYHAGE et coll. (84), en nous limitant aux ions oxygénés, qui sont les plus caractéristiques de la fragmentation des esters méthyliques à longue chaîne. Dans aucun cas il n'apparait d'anomalie dans la série m/z = 14n + 59. Le pic à m/z = M-31 est plus intense que le pic à m/z = M-29, sauf pour les termes en C25 (fig. 52), C27 (fig. 54), C29 (fig. 56), car ils sont contaminés par les diacides en C22, C24 et C26.

La figure 45 montre un exemple de comparaison entre le spectre du tétracosanoate de méthyle (C24) isolé de la cire Fa et le spectre de ce composé d'après (84).

III-3 Identification d'α-ω diacides.

Sur la colonne OV-1 utilisée les acides gras à nombre n impair d'atomes de carbone et les diacides à n-3 atomes de carbone sont mal séparés. Il en résulte que les spectres des esters méthyliques des acides en C25, C27 et C29 contiennent

m/z	Pics théoriques			Pics observés		
	C22	C24	C26	Fig.52	Fig.54	Fig.56
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 XXIII: Pics caractéristiques d'esters diméthyliques de diacides normaux et pics observés dans nos spectres.

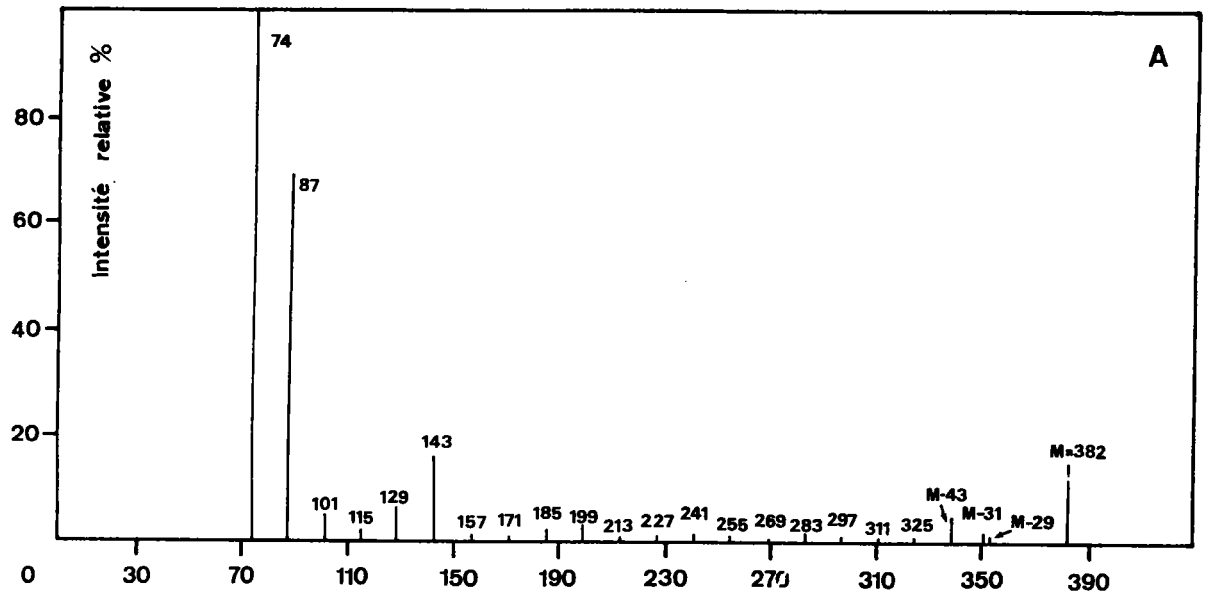
des ions provenant de ces diesters. Le tableau XXIII donne les nombres de masse des ions caractéristiques des esters diméthyliques des acides docosanedioïque (C22), tétracosanedioïque (C24) et hexacosanedioïque (C26) ainsi que les pics effectivement observés.

Dans les spectres des esters méthyliques des monoacides en C25, C27, C29 (fig. 52, 54, 56) nous observons les pics caractéristiques des esters diméthyliques des diacides en C22, C24, C26 respectivement. Les pics les moins intenses, m/z = M et m/z = M-92, ne sont pas visibles, puisqu'ils représentent dans le spectre du docosanedioate de méthyle pur moins de 3% et 6% respectivement du pic de base à m/z = 98 (87). Leur faible intensité ou leur absence n'exclut donc pas la présence de diacides.

Les pics à m/z = M-31 des diesters se superposent aux pics à m/z = M-29 des monoesters qu'ils accompagnent, ce qui explique l'intensité inhabituelle des pics à m/z = M-29 (367, 395, 423) par rapport aux pics à m/z = M-31 (365, 393, 423) des monoesters.

L'utilisation d'une colonne capillaire permet de mieux séparer ces diesters des monoesters, mais nous n'avons pas renouvelé l'analyse de l'échantillon Fa par couplage CPV-SM. Nous avons par contre analysé de cette façon les fractions acides LOa et VOa. La figure 57 nous montre le spectre du

diester méthylique de l'acide hexacosanedioïque (pic 26 fig. 33). Ceci confirme que les composés qui sont élués sur colonne apolaire immédiatement après les acides à nombre n impair d'atomes de carbone sont des diacides à n-3 atomes de carbone.



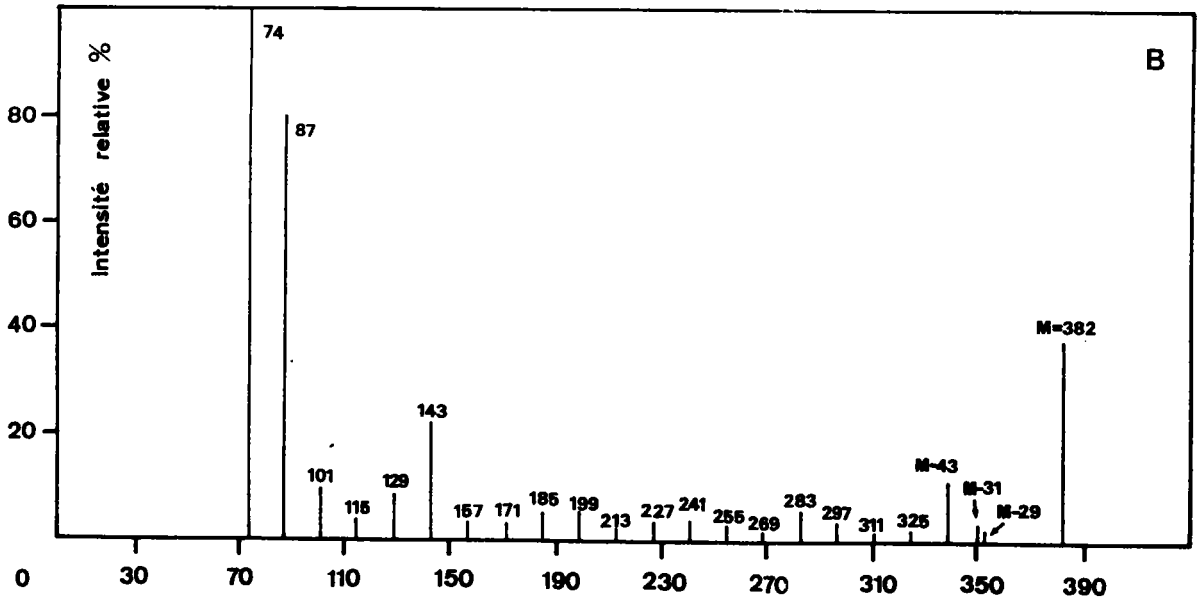


Fig . 45: Tétracosanoate de méthyle, spectre de masse partiel. A: isolé de la cire Fa; B: d'après (84).

IV- IDENTIFICATION D'HYDROXY-ACIDES.

IV-1 Spectres de masse d'ω-hydroxy-acides.

Après silylation des groupements hydroxyles par le BSA (N-O-bis-triméthylsilylacétamide), il est possible de chromatographier les esters méthyliques des acides gras hydroxylés sous forme de leur éthers triméthylsilylés.

Nous avons vu que de cette manière nous avons pu mettre en évidence par CPV dans la fraction acide Fa une série homologue d'acides gras hydroxylés en position ω de C16 à C28, réprésentant 6,4% de cette fraction. Les ω-hydroxy-acides en C22, C24 et C26 sont les plus abondants (environ 70% des hydroxy-acides).

Les spectres de masse de ces hydroxy-acides obtenus par couplage CPV-spectrométrie de masse sont représentés figures 58, 59 et 60. La fragmentation observée est caractéristique des composés de structure:

$$(CH_3)_3SiO - (CH_2)_n - COOCH_3.$$

Ceux-ci ont été étudiés pour n = 15 et 21 par EGLINTON et coll. (88).

On observe en dehors d'un faible pic moléculaire:

- deux pics intenses à m/z = M-15 (élimination d'un méthyle du groupement TMSi) et à m/z = M-47 (élimination d'un méthyle et de méthanol); le pic métastable correspondant à la transition M-15 ⟶ M-47 est bien visible à $m^* = (M-47)^2/(M-15)$;
- un pic plus faible à m/z = M-31 (élimination d'un radical OCH_3);
- un pic à m/z = M-90 (élimination d'une molécule de triméthylsilanol $(CH_3)_3SiOH$);
- dans le domaine des m/z plus faibles, les ions:

$$CH_2 = CH - C\begin{matrix} O - CH_3 \\ OSi(CH_3)_3 \end{matrix}\Big]^+ \qquad CH_2 = C\begin{matrix} OSi(CH_3)_3 \\ OCH_3 \end{matrix}\Big]^{+\cdot}$$

m/z = 159 m/z = 146

- enfin les ions caractéristiques du groupement TMSi:

$$(CH_3)_3Si\Big]^+ \qquad (CH_3)_2Si = OH\Big]^+ \qquad CH_2 = O - Si(CH_3)_3\Big]^+$$

m/z = 73 m/z = 75 m/z = 103

Les spectres de masse (fig. 58, 59, 60) correspondent respectivement aux éthers TMSi de l'hydroxy-22 docosanoate de méthyle, de l'hydroxy-24 tétracosanoate de méthyle et de l'hydroxy-26 hexacosanoate de méthyle. Nous avons également enregistré quelques spectres de masse des ω-hydroxy-acides identifiés par CPV dans les fractions acides des échantillons VO et LO (pics chromatographiques 16 et 20, fig. 22; pic 27, fig.33). Les spectres obtenus correspondent bien aux hydroxy-acides en C22, C24 et C26.

IV-2 Spectres de masse d'α-ω diols.

Nous avons d'autre part identifié les ω-hydroxy-acides sous forme d'α-ω diols en réduisant au préalable la cire Fa par $NaAl(OC_2H_4OCH_3)_2$. Les α-ω diols peuvent être séparés des alcools gras et des autres composés par chromatographie sur colonne d'alumine (fraction V). Aprés silylation par le BSA, les α-ω diols ainsi obtenus sont analysés par CPV-SM. Les spectres de masse (fig. 61 à 68) correspondant aux pics chromatographiques de la figure 17 présentent les mêmes caractéristiques que les spectres du décanediol 1,10 bis-TMSi-éther et du docosanediol 1,22 bis-TMSi-éther étudiés par Mc CLOSKEY et coll. (89).

On observe dans le domaine des m/z élevées:

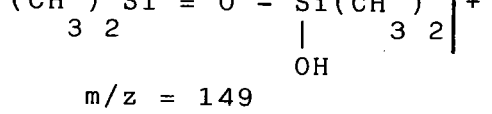
- un ion moléculaire de très faible intensité;
- les pics à m/z = M-15 (élimination de CH_3), à m/z = M-31 (élimination de CH_3 et de méthane), avec observation du pic métastable correspondant à la transition M-15 ⟶ M-31;
- les pics à m/z = M-90 (élimination de triméthylsilanol, m/z = M-105 (élimination de TMSiOH + CH_3), m/z = M-180 (élimination de deux molécules de TMSiOH).

L'ion doublement chargé à m/z = (M-30)/2 est caractéristique des α-ω diols bis TMSi éthers.

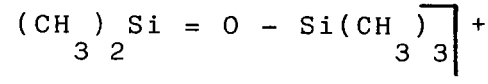
Les ions:

$$(CH_3)_2Si = O - CH_2 - OSi(CH_3)_3\Big]^+ \qquad (CH_3)_3Si - \underset{\underset{H}{|}}{O} - \underset{\underset{OH}{|}}{Si}(CH_3)_2\Big]^+$$

m/z = 177 m/z = 165



m/z = 149



m/z = 147

sont caractéristiques de composés contenant deux groupements TMSi.

Enfin on observe les ions à m/z = 103, m/z = 75, m/z = 73 précédemment cités.

En conclusion, grâce à l'analyse de leurs éthers triméthylsilylés, par couplage CPV-SM, nous avons démontré l'existence dans une cire de tourbe d'acides gras ω-hydroxylés de C16 à C28. En outre ce travail permet de constituer une collection de spectres de masse de référence pour les dérivés TMSi de trois ω-hydroxy-alcanoates de méthyle (C22, C24, C26) et de huit α-ω diols de C16 à C28.

V- IDENTIFICATION DE n-ALCANES.

Le spectre de masse d'un n-alcane est bien plus simple que celui d'un ester méthylique d'acide gras. Les ions les plus importants sont les ions de la série CnH2n+1. Le pic à m/z = 43 (n = 3) est le pic de base. A partir de n = 3 l'intensité de ces pics décroît régulièrement lorsque n augmente. Aux m/z élevées on trouve le pic de l'ion moléculaire CnH2n+2, qui est d'intensité faible. 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 CnH2n+1 (90).

Nous avons enregistré les spectres de quelques alcanes des fractions insaponifiables des divers échantillons. Les figures 69 à 71 nous montrent les spectres des n-alcanes en C27, C29, C31 (pics 9, 12 et 15, fig. 37), où l'on remarque l'absence de ramification par la décroissance régulière de l'intensité des ions dans la série m/z = 14n + 1.

Les n-alcanes obtenus par la méthode de BERTHELOT ont également été identifiés par CPV-SM. Les spectres correspondants sont essentiellement ceux d'alcanes normaux, ce qui confirme, si besoin en était, la structure linéaire des acides gras.

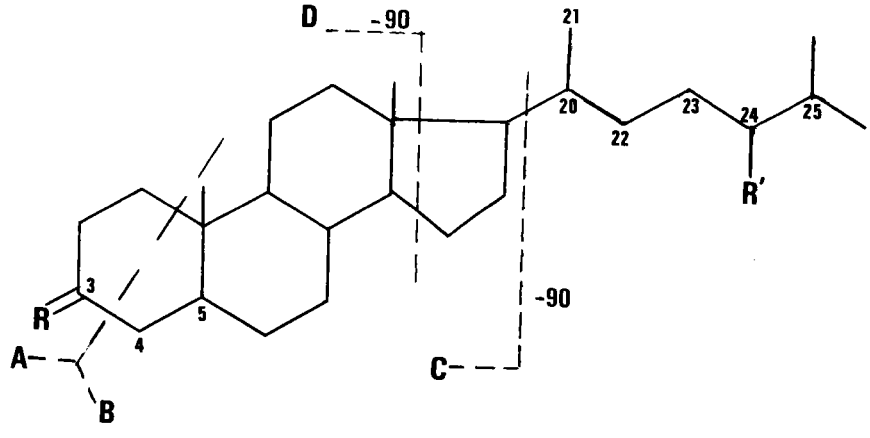
VI- IDENTIFICATION D'ALCOOLS GRAS.

Les spectres des éthers TMSi des alcools gras présentent principalement un ion intense à m/z = M-15 (élimination d'un méthyle), le pic moléculaire étant très faible. On retrouve par ailleurs les fragments caractéristiques des dérivés silylés à m/z = 73, 75 et 103 (91).

Bien que les alcools gras dans les diverses fractions insaponifiables puissent être facilement identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des alcools gras provenant de la réduction des acides gras (échantillon Far), nous avons enregistré les spectres de masse de quelques alcools gras (C28, C30, C32). Ces alcools ainsi identifiés (voir fig. 72 à 74) nous servent de points de repère dans la zone la plus complexe des chromatogrammes où sont élués les stérols et les triterpénoïdes.

VII- IDENTIFICATION DE STEROIDES.

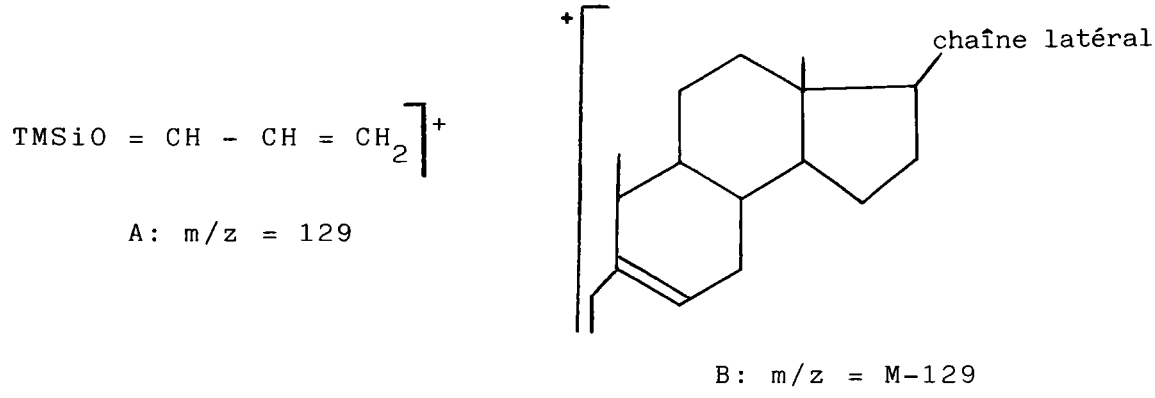
(On trouvera en annexe X la numérotation des squelettes carbonés des stéroïdes et des triterpénoïdes.)



SCHEMA I : Fragmentation des stérols.

	R	R'	Δ	
I-1	H, OTMSi	CH_3	5	campestérol
I-2	H, OTMSi	$CH_2 - CH_3$	5	ß-sitostérol
I-3	H, OTMSi	CH_3	-	campestanol
I-4	H, OTMSi	$CH_2 - CH_3$	-	ß-stigmastanol
I-5	H, OTMSi	$CH_2 - CH_3$	5, 22	stigmastérol
I-6	H, OTMSi	$CH_2 - CH_3$	22	stigmasta-22ène-3ol
I-7	O	H	-	3-cholestanone
I-8	O	$CH_2 - CH_3$	-	3-stigmastanone

Les spectres de masse des éthers TMSi des stérols ol-3 ène-5 sont caractérisés par un important pic à m/z = M-129 (fragment B) et un pic à m/z = 129 (fragment A) (92,93), comme le montre le schéma de fragmentation (schéma 1).



L'intensité de l'ion à m/z = 129 est supérieure à celle de l'ion à m/z = M-129. La situation est inversée pour les méthyl-4 ou diméthyl 4,4 stérols.

Outre le pic moléculaire à m/z = M et le pic à m/z = M-15 (élimination d'un méthyle), on trouve les fragments caractéristiques des dérivés silylés:

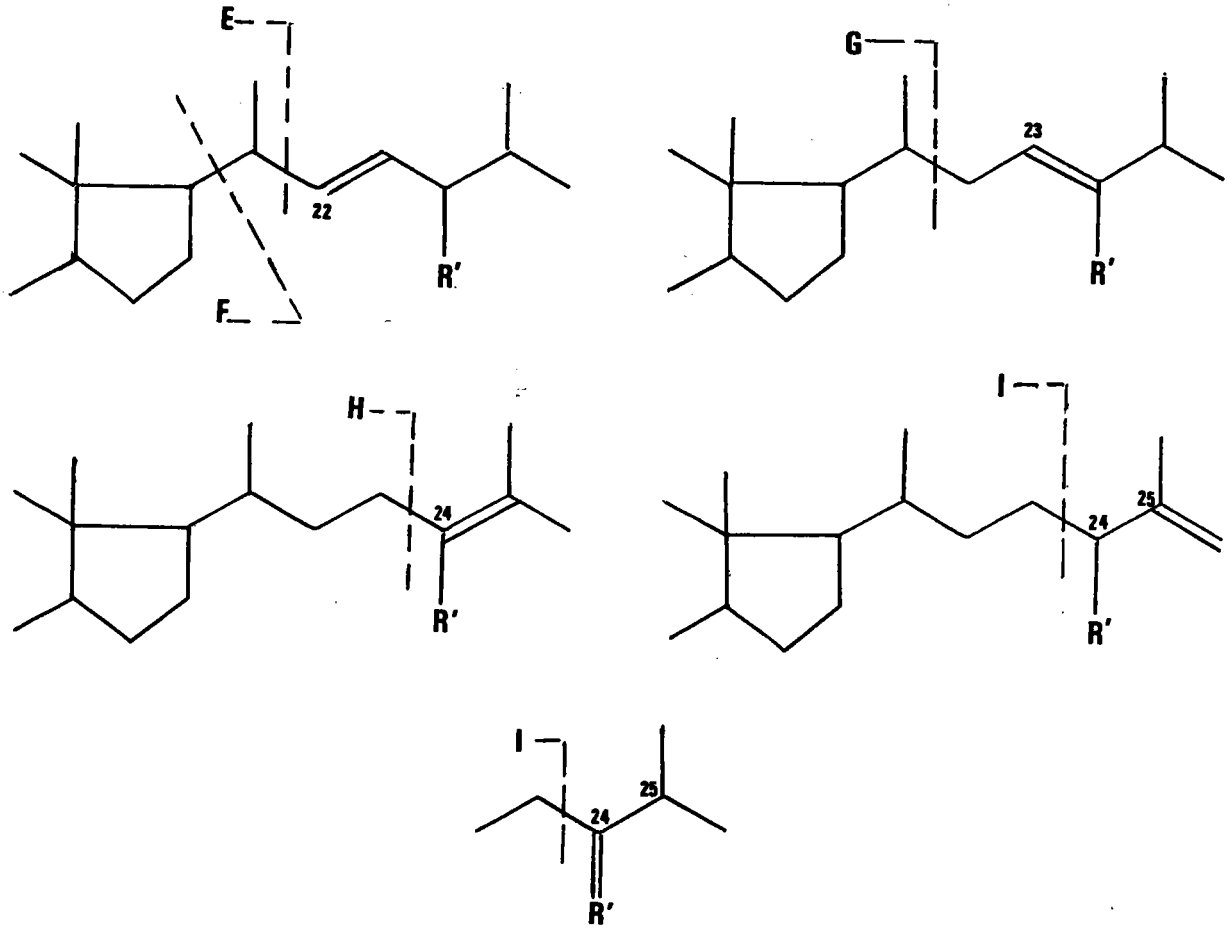
- m/z = M-90 (élimination de TMSiOH);
- m/z = M-105 (élimination de TMSiOH et d'un méthyle);
- m/z = 73 et m/z = 75.

L'ion C résulte de la perte de la chaîne latérale et de l'élimination supplémentaire de TMSiOH. On trouve cet ion dans les composés I-1, I-2, I-5 à m/z = 255 et à m/z = 257 dans les composés à cycles saturés I-3, I-4, I-6.

Pour ces derniers le pic de base à m/z = 215 provient de la coupure D avec élimination de TMSiOH. Suivant la position de la double liaison dans la chaîne latérale on observe des fragments différents (94) (schéma 2):

- Δ 22: fragment E à m/z = M-83-R' (I-5 m/z = 372; I-6 m/z = 374);
- Δ 23: fragment G à m/z = M-82-R';
- Δ 24: fragments H, triplets à m/z = M-84-R', M-83-R', M-82-R';
- Δ 25 et méthylène-24 ou éthylidène: fragment I à m/z = M-69-R'.

On trouvera en outre un ion F à M-chaîne latérale-H ou -2H.



SCHEMA 2: Fragmentation de la chaîne latérale des stérols en fonction de la position de la double liaison dans la chaîne.

Dans le tableau XXIV nous comparons les spectres de masse de stéroïdes de référence et ceux de stéroïdes isolés à partir de la tourbe "Floratorf" en nous limitant aux ions caractéristiques. Dans ce tableau comme dans les suivants les intensités relatives en % des divers ions sont données entre parenthèses.

Cette comparaison nous permet d'identifier les stérols suivants dans la tourbe "Floratorf":

- Stéroïde 1 (pic 39 fig. 21, spectre fig. 75) = I-1: campestérol;
- Stéroïde 2 (pic 40 fig. 21, spectre fig. 76) = I-3: campestanol;
- Stéroïde 3 (pic 41 fig. 21, spectre fig. 77) = I-5: stigmastérol;
- Stéroïde 4 (pic 42 fig. 21, spectre fig. 78): stigmasta-22-ène-3-ol;
- Stéroïde 5 (pic 43 fig. 21, spectre fig. 79): ß-sitostérol;
- Stéroïde 6 (pic 44 fig. 21, spectre fig. 80): ß-stigmastanol (5αH).

Fragments m/z (%)	Références (92, 93, 95)					Tourbe					
	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	St1	St2	St3	St4	St5	St6
M	472 (32)	486 (37)	474 (49)	488 (37)	484 (63)	472 (60)	474 (57)	484 (74)	486 (72)	486 (47)	488 (61)
M-15	457 (8)		459 (55)	473 (46)	469 (8)	457 (10)	459 (39)	469 (7)	471 (25)	471 (5)	473 (39)
M-90	382 (77)	396 (80)	384 (18)	398 (44)	394 (77)	382 (61)	384 (25)	394 (56)	396 (3)	396 (60)	398 (19)
M-105	367 (31)	381 (30)	369 (32)	383 (36)	379 (20)	367 (29)	369 (26)	379 (19)	381 (28)	381 (23)	383 (23)
M-129 B	343 (95)	357 (93)			355 (22)	343 (79)		355 (17)		357 (70)	
A	129 (100)	129 (100)			129 (100)	129 (100)		129 (100)		129 (100)	
C	255 (13)	255 (16)			255 (78)	255 (13)		255 (43)	257 (100)	255 (10)	
D	215 (5)		215 (100)	215 (100)	215 (9)	215 (8)	215 (100)	215 (16)	215 (28)	215 (7)	215 (100)
E				372 (7)				372 (8)	374 (69)		
Autres			306 (20)				306 (27)		346* (53)		306 (22)

TABLEAU XXIV: Fragments typiques des stérols (* M-chaîne latérale).

On trouve dans la fraction insaponifiable Fi un composé présentant les mêmes caractéristiques spectrales que le ß-stigmastanol (pic 29 fig. 20): il s'agit probablement de l'épimère 5ßH élué plus rapidement que l'épimère 5αH.

Les spectres des composés (pics 17, 18, 19, 20, 21 fig. 28) isolés de la tourbe de Vitrimont sont identiques aux spectres respectivement du campestérol, du campestanol, du ß-sitostérol et du ß-stigmastanol (5αH).

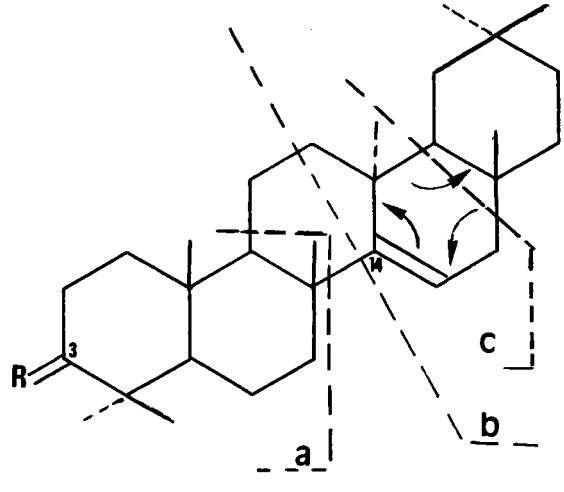
De même les spectres des composés (pics 19 et 20 fig. 37) isolés de l'anmoor de Lachaussée sont identiques à ceux du ß-sitostérol et du ß-stigmastanol (5αH).

Le spectre de I-7 (cholestanone-3) présente les ions suivants: m/z = M, M-15 et m/z = 231 (élimination de la chaîne latérale) ainsi que les pics à m/z = 246, 217, 163 (96). On retrouve ces derniers ions également dans le spectre du méthyl-4 cholestane (CO et C_2H_4 ayant même masse). Le spectre de ce composé comporte en plus un ion à m/z = 262 qui se déplace à m/z = 290 pour le méthyl-4 stigmastane (97). Cet ion ne figure pas dans le spectre de I-7. Le spectre (fig. 81) du stéroïde 7 (pic 23 fig. 19) présente les ions à m/z = 414 (M), 399 (M-15), 246, 231 (pic de base), 217 et 163. Nous concluons que ce composé est la stigmastanone-3.

VIII- IDENTIFICATION DE TRITERPENOIDES.

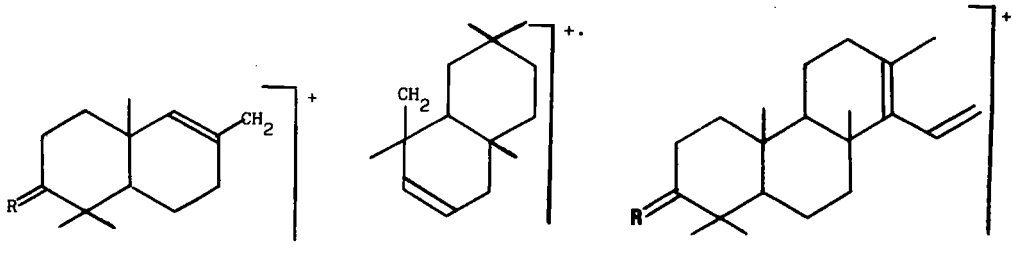
Dans nos échantillons les alcools triterpéniques sont étudiés sous forme d'éthers TMSi. Nous avons trouvé peu de données concernant ces éthers TMSi dans la littérature. Néanmoins les modes de fragmentation à l'intérieur d'une même famille de triterpénoïdes sont connus. Nous avons déduit par comparaison avec des spectres de référence de divers dérivés, en particulier de l'alcool libre, de l'acétate ou de l'éther méthylique, compte tenu de l'influence du groupement TMSi, la structure des alcools triterpéniques présents dans les cires.

VIII-1 Famille du taraxérène.



SCHEMA 3: Fragmentation des composés dérivés du taraxérène.

	R	
II-1	H_2	Taraxérène
II-2	H,OH	Taraxérol
II-3	H,OCH_3	Taraxérol méthyl-éther
II-4	H,OTMSi	Taraxérol TMSi éther
II-5	O	Taraxérone



a b c

Fragments m/z (%)	Références (95)				Tourbe		
	II-1	II-2	II-3	II-5	TrF1	TrF4	TrF9
M	410 (50)	426 (22)	440 (72)		410 (24)	424 (33)	498 (13)
M-15	395 (14)	411 (11)	425 (13)		395 (14)	409 (11)	483 (4)
M-HX			408 (8)				
M-HX-15		393 (2)	393 (7)				393 (4)
a	191 (13)		221 (11)	205 (54)	191 (15)	205 (53)	279 (3)
b	204 (100)	204 (100)	204 (100)	204 (100)	204 (100)	204 (100)	204 (100)
c	286 (45)	302 (43)	316 (51)	300 (81)	286 (49)	300 (84)	374 (13)
c-15	271 (21)	287 (36)	301 (19)	285 (60)	271 (40)	285 (38)	359 (7)
c-HX		284 (5)	284 (10)				284 (6)
c-HX-15		269 (17)	269 (13)				269 (14)
a-HX		189 (35)	189 (17)				189 (29)

TABLEAU XXV: Fragments typiques des composés de la famille du taraxérène.

Le taraxérène (II-1) et ses dérivés se fragmentent en donnant les ions (98) (schéma 3):

- a dont la masse dépend du substituant R;
- b à m/z = 204 qui est généralement le pic de base;
- c à m/z = M-124 résultant d'une fragmentation rétro-Diels-Alder (RDA).

On trouve par ailleurs les ions à :

- m/z= M-15 (élimination d'un méthyle);
- m/z = M-HX (X = OH, OCH_3, OTMSi);
- m/z = M-HX-15;
- ainsi que les ions a-HX, c-HX, c-HX-15.

Dans le tableau XXV nous donnons les principaux ions de composés de référence et leurs intensités relatives d'après (95) et ceux des triterpénoïdes F1, F4, F9 de la fraction insaponifiable Fi.

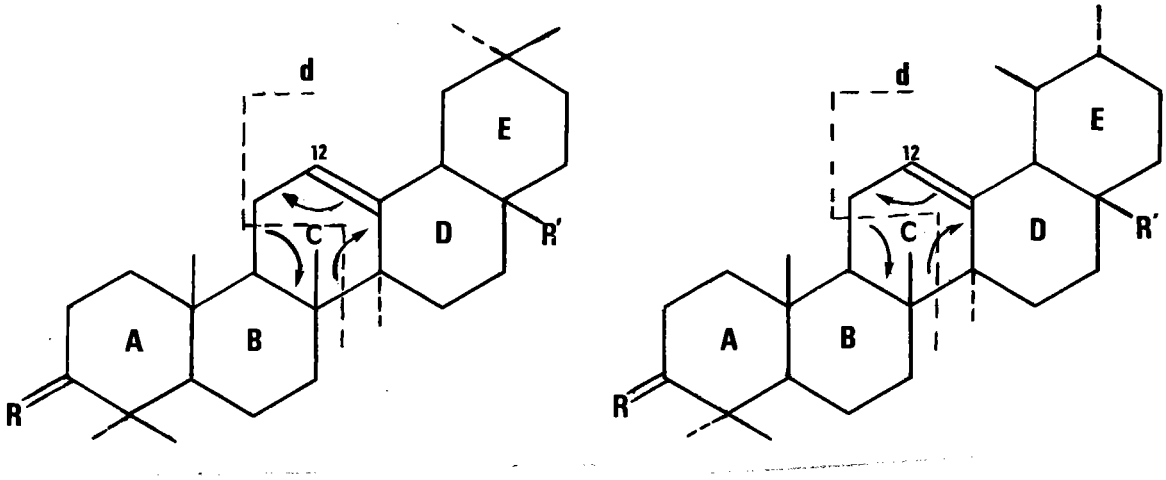
Du tableau XXV nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

- Triterpénoïde F1 (pic 15 fig. 18 et 19, spectre fig. 82) = II-1: taraxérène;
- Triterpénoïde F4 (pic 21 fig. 18 et 19, spectre fig. 83) = II-5: taraxérone;
- Triterpénoïde F9 (pic 29 fig.18 et 20, spectre fig. 84) = II-4: taraxérol TMSi éther.

VII-2 Famille de l'oléanène et de l'ursène (Δ12).

Les cycles A et B sont identiques à ceux du taraxérène: on va donc retrouver les fragments a et a-HX. Le fragment d résulte d'une décomposition RDA de l'ion moléculaire (schéma 4): c'est le pic de base à m/z = 218. L'ion d peut perdre un méthyle d'où le fragment à m/z = d-15 = 203. L'intensité de l'ion d est beaucoup plus faible lorsque le radical R' est différent d'un groupement méthyle et les ions d-15 (m/z = 203) et d-HX (m/z = 216) sont favorisés.

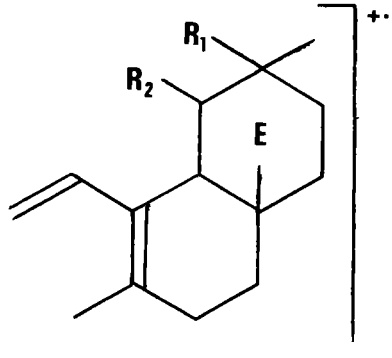
On trouvera d'autre part les ions à m/z = M-15, M-HX et M-HX-15.



Δ 12 Oléanène Δ 12 Ursène

SCHEMA 4: Fragmentation des composés dérivés du Δ 12 oléanène et du Δ 12 ursène.

	R	R'			R	R'	
III-1	H_2	CH_3		IV-1	H_2	CH_3	
III-2	H,OH	CH_3	ß-amyrine	IV-2	H,OH	CH_3	α-amyrine
III-3	H,OAc	CH_3		IV-3	H,OAc	CH_3	
III-4	H,OTMSi	CH_3		IV-4	H,OTMSi	CH_3	
III-5	H,OH	CH_2OH	érythrodiol	IV-5	H,OH	CH_2OH	uvaol
III-6	H,OAc	CH_2OAc					



d

III $R_1 = CH_3$ $R_2 = H$
IV $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$

Le tableau XXVI permet de comparer les spectres de composés de référence (95, 98) et les triterpénoïdes de la tourbe "Floratorf" ou de Vitrimont. D'après (99) la ß-amyrine (acétate ou éther TMSi) est éluée avant l'α-amyrine sur colonne apolaire. De plus le pic à m/z = 203 est plus intense que le pic à m/z = 189 pour la ß-amyrine.

Nous en concluons que:

- Triterpénoïde F10 (pic 30 fig. 18 et 20, spectre fig. 85) = III-4: ß-amyrine, TMSi éther (les petits pics à m/z =486, 396 et 357 proviennent de la

présence d'une petite quantité de ß-sitostérol);

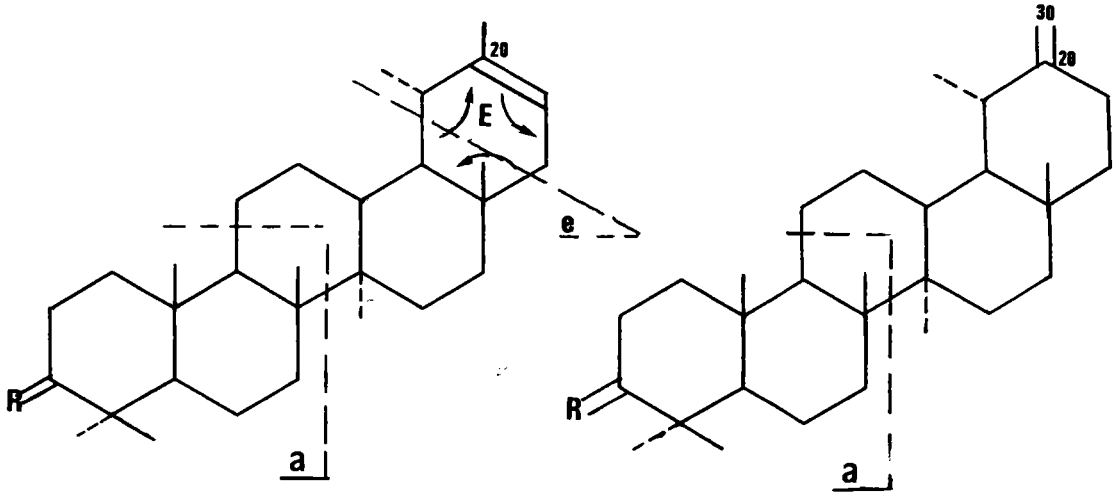
- Triterpénoïde F11 (pic 31 fig. 18 et 20, spectre fig. 86) = IV-4: α-amyrine, TMSi éther (le pic à m/z = 495 provient de l'ion à m/z = M-15 de l'éther TMSi du triacontanol imparfaitement séparé de l'α-amyrine).

- Le spectre du triterpénoïde V3 trouvé dans la tourbe de Vitrimont (pic 25 fig. 28, spectre fig. 87) ressemble davantage à celui de III-5 (ou de son diacétate III-6) qu'à celui de la bétuline VII-6 qui présente un pic à m/z = M-43 (voir aussi tableau XXVII). Le pic à m/z = 203 (pic de base pour le composé III-5) étant inférieur au pic à m/z = 189 nous pensons que le triterpénoïde V3 est l'uvaol (IV-5), bis TMSi éther.

Fragments m/z (%)	Références (95, 98)							Tourbes		
	III-1	III-3	III-4	IV-1	IV-3	III-5	III-6	TrF10	TrF11	TrV3
M	410 (4)	468 (<1)	498 (2)	410 (11)	468 (<1)	442 (3)	526 (1)	498 (<1)	498 (<1)	586 (2)
M-15	395 (3)		483 (1)	395 (5)						
M-R'						413 (2)	453 (11)			483 (22)
M-HX			408 (<1)			424 (1)	466 (23)			496 (35)
M-HX-15			393 (1)			411 (4)		393 (<1)	393 (1)	
a	191 (19)	249 (<1)	279 (3)	191 (21)	249 (<1)	207 (12)	249 (5)	279 (2)	279 (4)	279 (4)
a-HX		189 (19)	189 (16)		189 (44)	189 (10)	189 (28)	189 (18)	189 (21)	189 (35)
d	218 (100)	218 (100)	218 (100)	218 (100)	218 (100)	234 (17)	276 (11)	218 (100)	218 (100)	
d-15 ou d-R'	203 (44)	203 (51)	203 (16)	203 (15)	203 (27)	203 (100)	203 (100)	203 (28)	203 (14)	203 (33)
d-HX						216 (12)	216 (69)			216 (7)

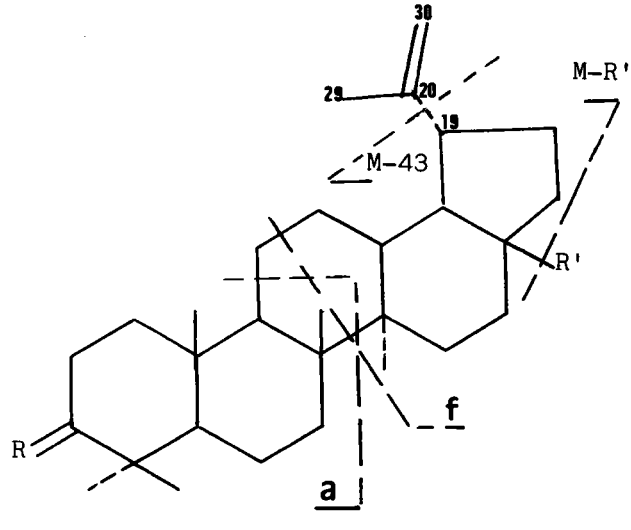
TABLEAU XXVI: Fragments typiques des composés de la famille du Δ 12 oléanène et Δ 12 ursène.

VIII-3 Autres dérivés de l'ursane et dérivés du lupane.



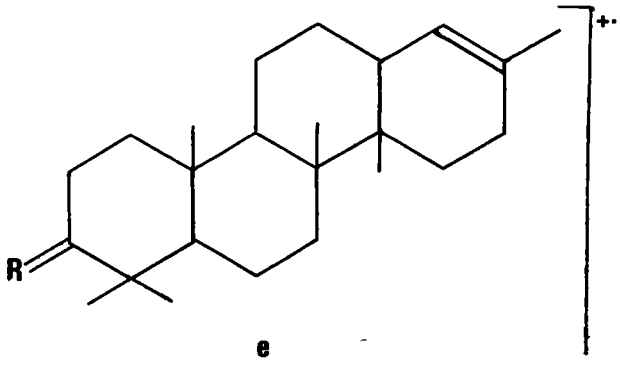
SCHEMA 5: Fragmentation du pseudo-taraxastérol et du taraxastérol.

	R			R	
V-1	H_2	ursa-20-ène	VI-1	H_2	ursa-20(30)-ène
V-2	H,OH	pseudo-taraxastérol	VI-2	H,OH	taraxastérol
V-3	H,OAc		VI-3	H,OAc	
V-4	H,OTMSi		VI-4	H,OTMSi	

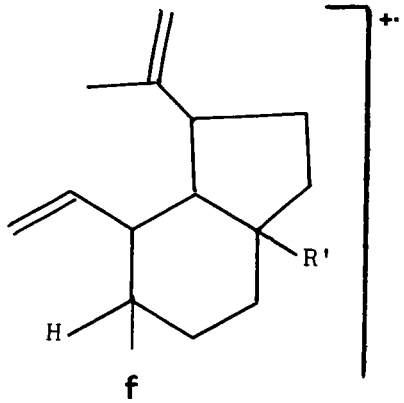


SCHEMA 6: Fragmentation des composés dérivés du 20(30) lupène.

	R	R'	
VII-1	H_2	CH_3	lupa 20-(30)-ène
VII-2	H,OH	CH_3	lupéol
VII-3	H,OAc	CH_3	
VII-4	H,OTMSi	CH_3	
VII-5	H,OH	CH_2OH	bétuline
VII-6	H, OTMSi	CH_2OTMSi	
VII-7	O	CH_3	lupénone



e



f

Fragments m/z (%)	Références (95, 98, 100)					Tourbes		
	V-3	VI-3	VII-3	VII-5	VII-7	TrF12	TrV3	TrF8
M	468 (<1)	468 (2)	468 (2)	442 (38)	424 (62)	498 (19)	586 (2)	424 (33)
M-15			453 (<1)	427 (9)	409 (21)	483 (5)		409 (2)
M-HX	408 (<1)	408 (2)	408 (<1)	424 (13)		408 (4)	496 (35)	
M-HX-15	393 (<1)	393 (<1)	393 (1)	409 (6)		393 (5)		
a	249 (4)	249 (7)	249 (7)	207 (75)	205 (100)	279 (10)	279 (4)	205 (60)
a-HX	189 (100)	189 (100)	189 (100)	189 (100)		189 (70)	189 (35)	
e	386 (*)							
e-HX	326 (*)							
f			218 (26)	234 (35)	218 (26)			218 (12)
f-HX				216 (2)			216 (7)	
M-R'				411 (64)			483 (22)	

TABLEAU XXVII: Fragments typiques des dérivés du pseudo-taraxastérol, du taraxastérol et du 20(30) lupène. (*) valeur non donnée par (100) mais pic présent dans les spectres de (98): m/z=386: 2%; m/z=326: 6%.

Les composés V donnent, en plus des ions à m/z = M, M-15, M-HX-15, a et a-HX communs avec les composés VI, un ion e à m/z = M-82 et surtout M-HX-82 = 326 par décomposition RDA du cycle E (schéma 5).

Pour les dérivés du lupène 20(30) (VII-1) on retrouve les fragments a, a-HX, M-HX, M-HX-15. Lorsque le substituant R' est différent d'un méthyle on observe un important fragment M-R' (schéma 6). Autres fragments: f (isomère de d), f-HX et M-43 (perte du groupement isopropényle + 2H).

Le triterpénoïde F12 (pic 33 fig. 20, spectre fig. 88) peut correspondre à l'éther TMSi de V-2, VI-2 ou VII-2. L'absence de pic e et e-HX permet d'éliminer V-2. La comparaison des temps de rétention sur colonne OV-1 d'après (100) nous permet de conclure que le triterpénoïde F12 est probablement le taraxastérol VI-2. Dans le tableau XXVII nous rappelons également le spectre du triterpénoïde V3 bis TMSi éther (probablement l'uvaol) qui présente quelques similitudes avec la bétuline VII-5.

Le spectre du triterpénoïde F8 (pic 27 fig. 19, spectre fig. 89) caractérisé par un important pic à m/z = 205 et à m/z = 218 est semblable à celui de la lupénone (VII-7). Le spectre de référence contient un pic à m/z = 314 (30%), mais les auteurs n'en ont pas donné d'explication (98). Nous pensons qu'il s'agit peut-être d'une contamination par un autre composé.

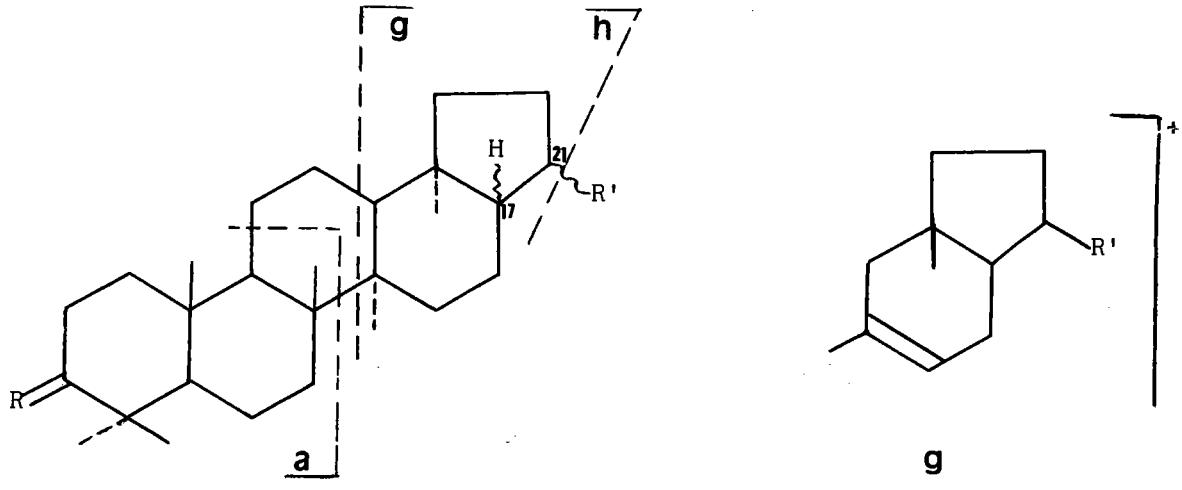
Ces pics à m/z = 205 et m/z = 218 sont aussi très importants dans les spectres des composés dérivés du Δ 13-18 oléanène. Pour la cétone-3 (formule XV page 133) l'ion a apparaît également à m/z = 205.

Le triterpénoïde F8 peut correspondre à l'une de ces deux cétones.

VIII-4 Hopanoïdes.

La fragmentation des composés de la famille du hopane (VIII-1) est donnée par le schéma 7 (101).

En plus du fragment a, que nous avons déjà rencontré à plusieurs reprises et qui revêt ici une importance particulière, on trouve les fragments g et h. Lorsque R' est un radical isopropényle il y a élimination de ce radical et de



SCHEMA 7: Fragmentation des hopanoïdes.

	R	R'	
VIII-1	H_2	$CH(CH_3)_2$	hopane
VIII-2	H_2	$CH(CH_3)-CH_2-CH_3$	30-homohopane (C31)
VIII-3	H_2	$CH(CH_3)-(CH_2)_3OH$	C32 hopanol
VIII-4	H_2	$C(CH_3)=CH_2$	hopène B
VIII-5	H,OH	$C(CH_3)=CH_2$	morétènol
VIII-6	H,OAc	$C(CH_3)=CH_2$	
VIII-7	H,OTMSi	$C(CH_3)=CH_2$	

2H: d'où il résulte que l'ion h apparait à m/z = M-43 pour VIII-4 comme pour VIII-1.

On trouve par ailleurs les ions M-15, M-HX, M-HX-15, a-HX. Pour VIII-1 les ions a et g sont confondus à m/z = 191 (pic de base).

Les stéréoisomères du hopane et de ses dérivés sont élués sur colonne apolaire dans l'ordre suivant:

hopane (17α-21β) < morétane (17β- 21α) << hopane (17β-21β).

D'autre part les intensités des ions a et g présentent des différences appréciables suivant la stéréochimie du composé.

En ce qui concerne les hydrocarbures, on a les relations suivantes entre les intensités de ces deux ions:

épimère 17α-21β	a >> g
épimère 17β-21α	a ≃ g
épimère 17β-21β	g > a

Fragments m/z (%)	Références (95, 101)						Tourbe				
	VIII-1 [1]	VIII-2 [1]	VIII-4 [2]	VIII-4 [3]	VIII-5	VIII-6	TrF2	TrF3	TrF14	TrF17	TrF18
M	412 (13)	426 (17)	410 (51)	410 (64)	426 (21)	468 (18)	410 (22)	426 (22)	498 (11)	528 (14)	528 (8)
M-15	397 (8)	411 (12)	395 (30)	395 (7)	411 (6)	453 (2)	395 (5)	411 (7)	483 (1)	513 (5)	513 (6)
M-HX						408 (15)			408 (2)		438 (3)
M-HX-15					393 (7)	393 (7)			393 (4)	423 (2)	423 (2)
a	191 (100)	191 (100)	191 (100)	191 (100)	207 (34)	249 (5)	191 (100)	191 (100)	279 (7)	191 (100)	191 (100)
a-HX					189 [4] (100)	189 [4] (100)			189 [4] (100)		
g	191 (100)	205 (39)	189 (95)	189 (20)	189 [4] (100)	189 [4] (100)	189 (21)	205 (27)	189 [4] (100)	307 (4)	307 (40)
g-HX										217 (15)	217 (65)
h	369 (3)	369 (4)	367 (10)	367 (4)	383 (2)	425 (2)		369 (2)		369 (14)	369 (11)
Autres pics			341 (20)				341 (4)				
			218 (10)	218 (55)			218 (6)				
			204 (12)	204 (38)			204 (13)				
			205 (12)	205 (58)			205 (9)				

TABLEAU XXVIII: Fragments typiques des hopanoïdes. [1] 17αH-21βH; [2] d'après (101); [3] d'après (95); [4] les ions a et g-HX coïncident à m/z = 189.

La comparaison (voir tableau XXVIII) avec des spectres de masse de référence (95,101) nous permet d'identifier dans la tourbe "Floratorf" les triterpénoïdes suivants:

- triterpénoïde F2 (pic 19, fig. 19, spectre fig. 90) = VIII-4, 22-29 hopène;

- triterpénoïde F3 (pic 20 fig. 19, spectre fig. 91) = VIII-2, homo-30 hopane (17αH-21βH);

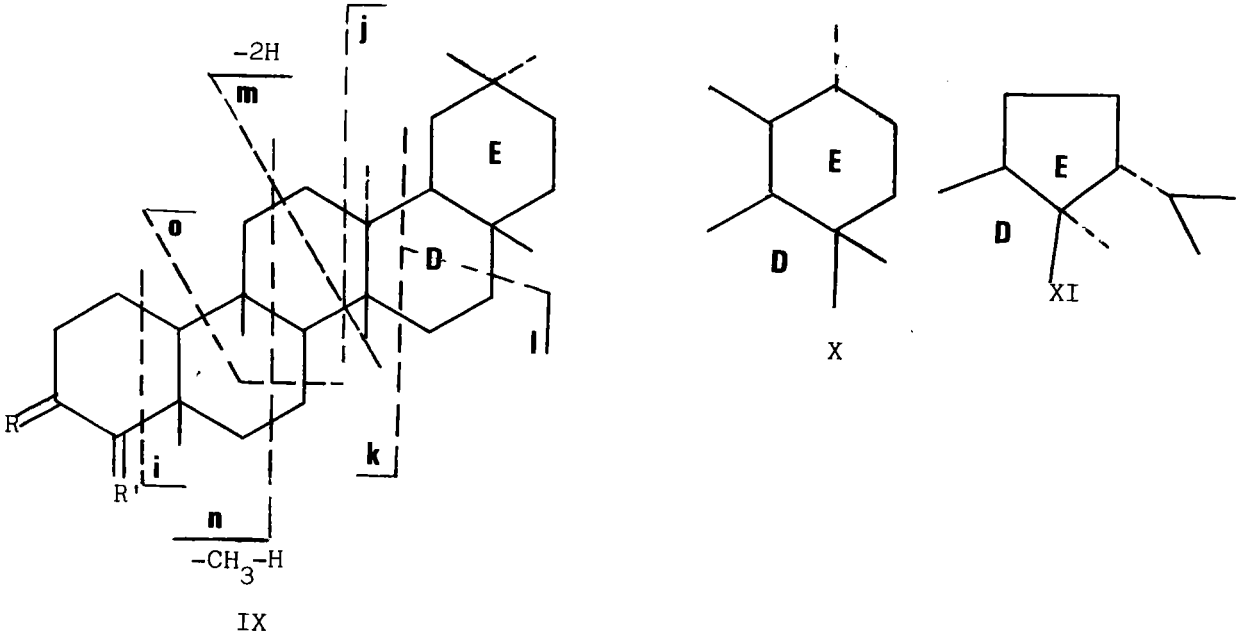
- triterpénoïde F14 (pic 35 fig. 20, spectre fig. 92) = éther TMSi de VIII-5, moréténol;

- triterpénoïde F17 (pic 45 fig. 18 et 20, spectre fig. 93) = éther TMSi de VIII-3, homo bis 30-31-hopane ol-32 (17αH-21βH);

- triterpénoïde F18 (pic 47 fig. 18 et 20, spectre fig. 94) = épimère 17βH-21βH du précédent.

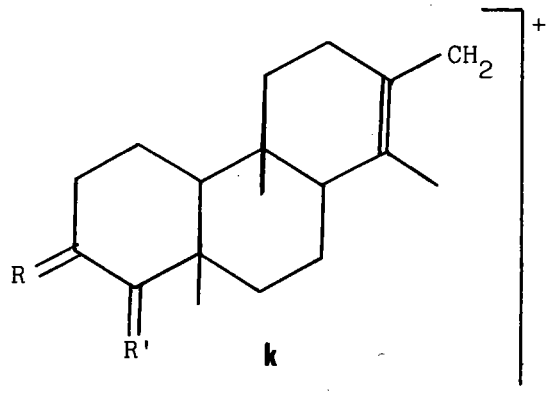
VIII-5 Famille du friedelane et analogues.

Le schéma 8 décrit la fragmentation du friedelane IX-1 et dérivés (102, 103), ainsi que d'analogues ne se distinguant du friedelane que par le cycle E (composés X et XI).

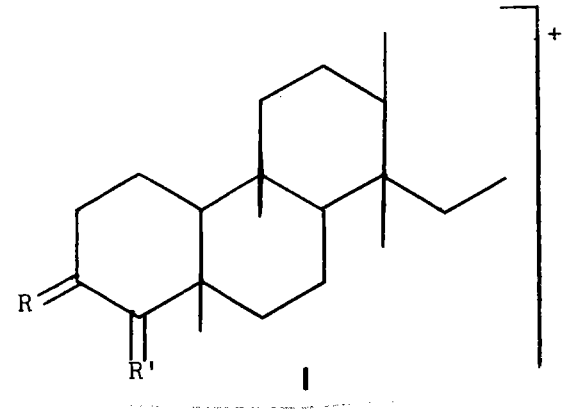


SCHEMA 8: fragmentation du friedelane et dérivés.

	R	R'	
IX-1	H_2	H,CH_3	friedelane
IX-2	H,OH	H,CH_3	3-friedelanol
IX-3	H,OTMSi	H,CH_3	
IX-4	O	H,CH_3	friedeline
IX-5	H,OH	CH_3	
X-1	H,OH	CH_2	
XI-1	H,OH	CH_2	



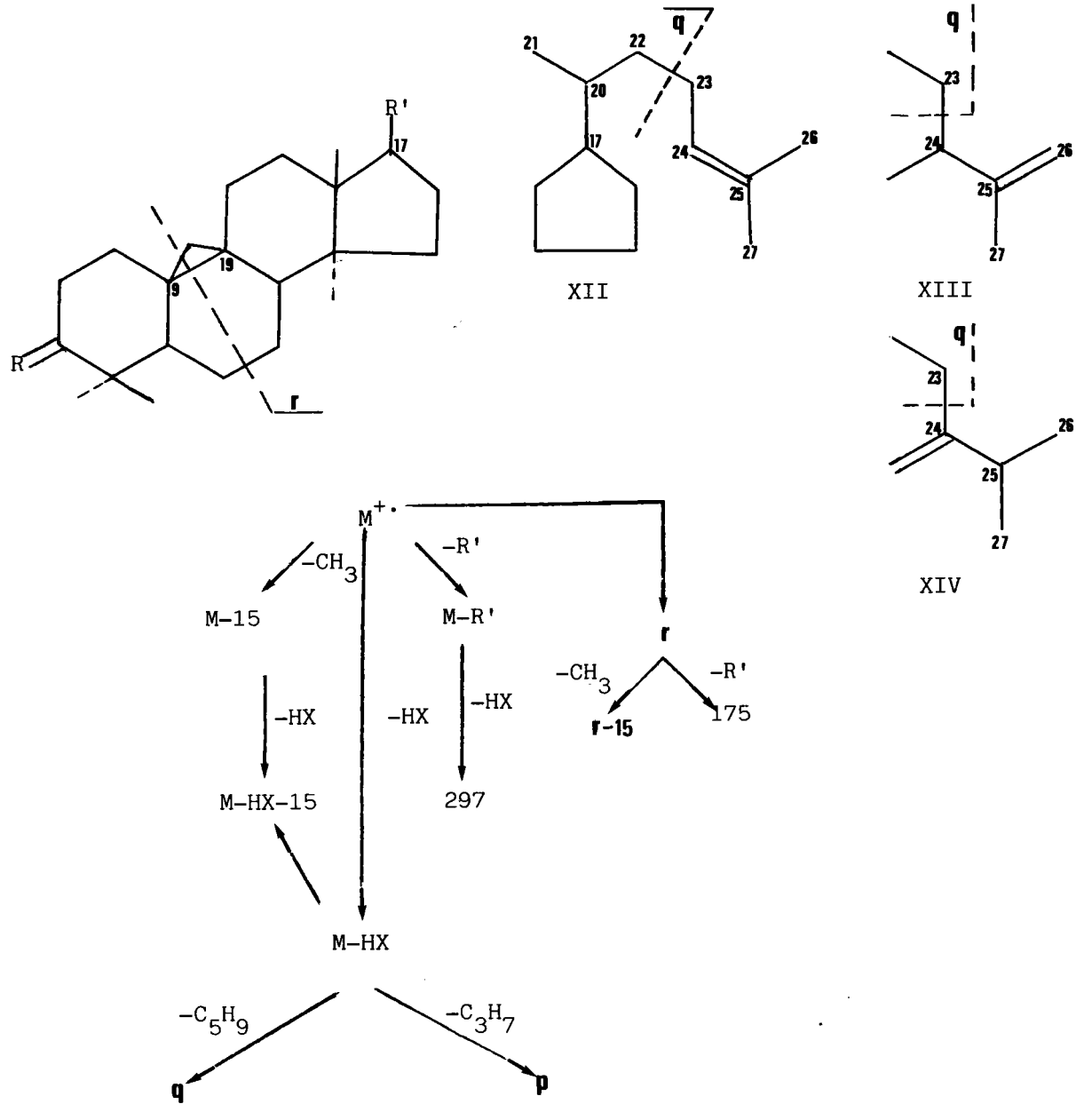
k



l

Fragments m/z (%)	Références (95, 102, 103)				Tourbes				
	IX-2	IX-4[1]	IX-4[2]	X-1 [3]	TrF6	TrF15	TrF13	TrF7[4]	TrV2
M	428 (100)	426 (100)	426 (29)	426 (87)	428 (8)	500 (11)	498 (31)	426 (27)	426 (27)
M-15	413 (35)	411 (12)	411 (11)	411 (23)	413 (13)	485 (10)	483 (18)	411 (15)	411 (6)
M-HX	410 (61)			408 (11)		410 (4)	408 (17)		
M-HX-15	395 (19)			393 (6)	395 (2)	395 (4)	393 (6)		
i	341 (<1)	341 (7)	341 (8)	341 (36)			341 (21)	341 (6)	341 (4)
j	205 (46)	205 (36)	205 (44)	205 (72)	205 (16)	205 (15)	205 (55)	205 (38)	205 (29)
k	275 (49)	273 (40)	273 (44)	273 (30)	275 (16)	347 (15)		273 (39)	273 (24)
l	304 (4)	302 (31)	302 (27)	302 (3)	304 (3)			302 (20)	302 (14)
m	218 (51)	218 (32)	218 (37)	218 (77)			218 (18)	218 (25)	218 (26)
n	165 (65)	163 (28)	163 (48)		165 (39)	237 (36)		163 (26)	163 (25)
o	273 (14)	273*	273*	273*			273 (10)	273*	273*

TABLEAU XXIX: Fragments typiques du friedelane et dérivés. [1] d'après (95); [2] d'après (102), pic de base à m/z = 109; [3] d'après (103), pic de base à m/z = 123; [4] pic de base à m/z = 109; * confondu avec k.



SCHEMA 9: Fragmentation des dérivés du 9-19 cyclolanostane.

	R	
XII-1	H,OH	Δ 24-cycloarténol
XII-2	H,OTMSi	
XIII-1	H,OH	cyclolaudénol
XIII-2	H,OTMSi	
XIV-1	H,OH	24-méthylène-cycloartanol
XIV-2	H,OTMSi	

Du tableau XXIX nous tirons les conclusions suivantes:
- triterpénoïde F7 (pic 26 fig. 19, spectre fig. 95) = IX-4: friedeline; le spectre du triterpénoïde V2 (tourbe de Vitrimont, pic 24 fig. 28 et 29) est identique à celui de F7;
- triterpénoïde F6 (pic 25 fig. 19, spectre fig. 96) = IX-2: friedelanol (non silylé);
- triterpénoïde F15 (pic 36 fig. 20, spectre fig. 97) = éther TMSi du friedelanol;
- en ce qui concerne le triterpénoïde F13 (pic 34 fig. 20, spectre fig. 98) on a une similitude avec X-1, mais le cycle E peut avoir les structures IX, X ou XI.

VIII-6 Dérivés du 9-19 cyclolanostane.

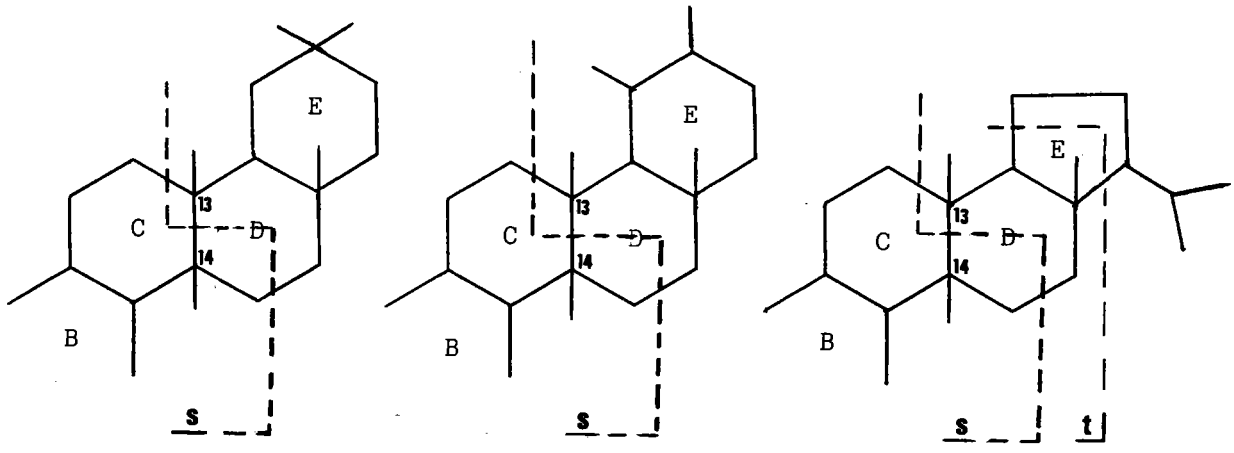
Leur fragmentation établie par APLIN et coll. (104) est résumée par le schéma 9. Le tableau XXX nous permet de comparer le spectre du triterpénoïde F16 (pic 37 fig. 20, spectre fig. 99) avec des composés de référence (95). Ce spectre correspond à l'éther TMSi du cyclolaudénol (XIII-1) ou du méthylène-24 cycloartanol (XIV-1). La distinction est possible par l'étude des spectres des cétones correspondantes (104).

VIII-7 Triterpénoïdes avec des méthyles en position 13 et 14.

Les composés de ce type donnent d'importants ions à m/z = M-15 et m/z = M-167 (fragment s). Les composés à cycle E pentagonal donnent un ion t à m/z = M-85 (voir schéma 10). Les composés à cycle E hexagonal donnent un ion à m/z = M-179 ainsi que des ions à m/z = 205, 218 (105).

Le composé XVI (voir page 133) produit également d'importants ions à m/z = M = 440, M-15-32 = 393 et m/z = M-167-32 = 241. Les pics à m/z = 425 (M-15) et m/z = 273 (M-167) sont les pics de base (95).

Ce sont ces pics que l'on trouve dans le spectre du ß-stigmastanol isolé de la tourbe de Vitrimont (spectre fig. 100), ce qui montre que ce dernier est élué avec un autre composé (pic 22 fig. 29). Nous identifions ce composé avec XVI (fernénol méthyl éther), avec une incertitude sur la position



SCHEMA 10: Fragmentation des triterpénoïdes comportant des méthyles en position 13 et 14.

Fragments m/z (%)	Références (95)				Tourbe
	XII-1 [1]	XII-2 [1]	XIII-1 [2]	XIV-1 [2]	TrF16 [2]
M	426 (30)	498 (2)	440 (25)	440 (20)	512 (3)
M-15	411 (46)	483 (8)	425 (35)	425 (36)	497 (6)
M-HX	408 (58)	408 (72)	422 (47)	422 (47)	422 (80)
M-HX-15	393 (69)	393 (74)	407 (59)	407 (60)	407 (38)
p	365 (28)	365 (55)	379 (24)	379 (24)	379 (63)
q	339 (30)	339 (58)	353 (23)	353 (16)	353 (18)
r	286 (63)	286 (16)	300 (48)	300 (41)	300 (15)
M-R'	315 (9)		315 (13)	315 (10)	
M-R'-HX	297 (10)	297 (8)	297 (17)	297 (21)	297 (9)
r-15	271 (30)	271 (16)	285 (12)	285 (13)	285 (5)
r-R'	175 (60)	175 (47)	175 (69)	175 (61)	175 (35)

TABLEAU XXX: Fragments typiques des dérivés du 9-19-cyclolanostane. Pics de base: [1] m/z = 109; [2] m/z = 107.

de la double liaison qui peut être en position 7, 8 ou 9-11, car ces différents composés ont même spectre de masse (105).

Il reste évidemment quelques triterpénoïdes que nous n'avons pas identifiés, comme par exemple ce composé de masse molaire 424, de formule brute $C_{30}H_{48}O$ (triterpénoïde F5) et dont le spectre de masse présente un pic de base à m/z = 324. Nous n'avons pas trouvé dans la littérature un tel composé (probablement une cétone pentacyclique monoinsaturée).

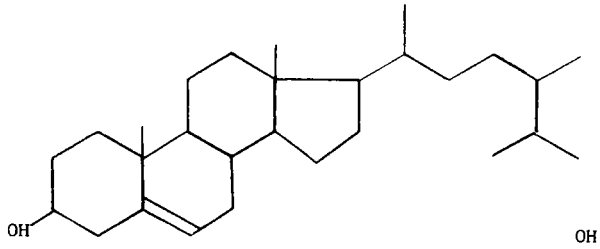
Nous récapitulons ci-après les formules des principaux stéroïdes et triterpénoïdes que nous avons identifiés dans les divers échantillons de tourbe.

IX- INTRODUCTION DIRECTE.

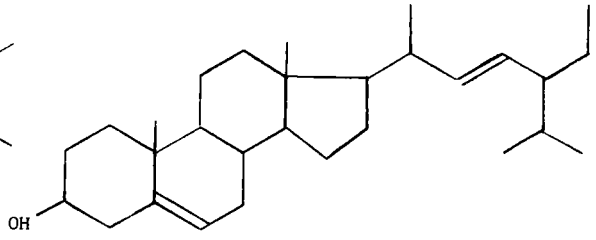
Les substances non volatiles en CPV représentant une fraction importante des cires, nous avons également étudié la fraction acide Fa méthylée par introduction directe dans la source ionique du spectromètre de masse, la température du dispositif d'introduction étant programmée de 50 °C à 250 °C. Des spectres 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 101 obtenu à 90 °C, on note la présence des ions caractéristiques: m/z = 74, 87, 143, ainsi que les ions moléculaires: M = 326 (C20), 340 (C21), 354 (C22), 368 (C23), 382 (C24), 396 (C25), 410 (C26), 424 (C27), 438 (C28). A 120 °C apparaissent les ions moléculaires M = 452 (C29), 466 (C30), 480 (C31), 494 (C32), 508 (C33) et 522 (C34). Vers 185 °C la volatilisation des esters méthyliques des acides gras est pratiquement terminée.

On trouve par ailleurs des ions à m/z = 320, 348, 376, 404, de formule brute $C_nH_{2n-4}O$ correspondant aux ions M-50 (élimination de méthanol et d'eau) des esters méthyliques des ω-hydroxy-acides (respectivement en C22, C24, C26 et C28).

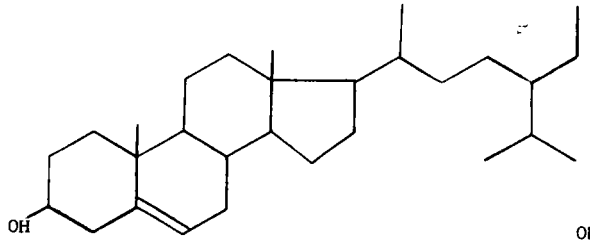
A partir de 185 °C, la complexité des spectres s'accroit et il n'est guère possible de mettre en évidence des



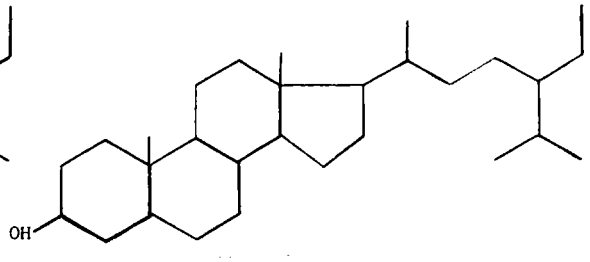
I-1 campestérol



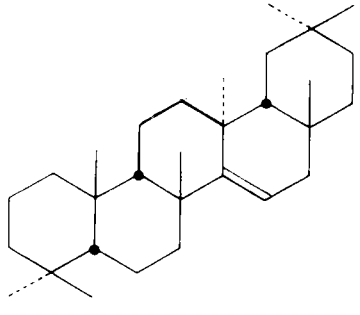
I-5 stigmastérol



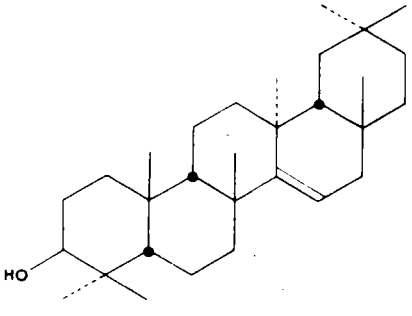
I-2 β-sitostérol



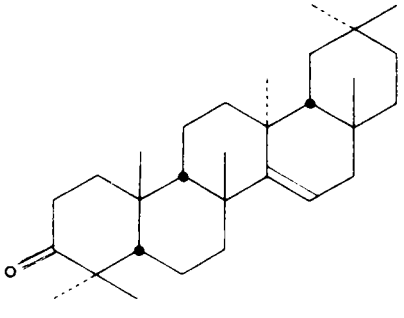
I-4 β-stigmastanol



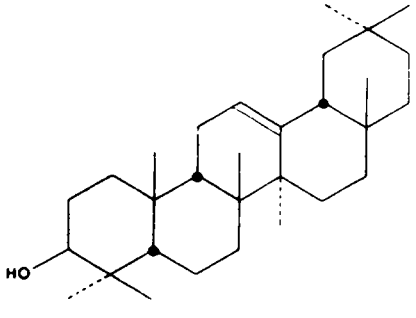
II-1 taraxérène



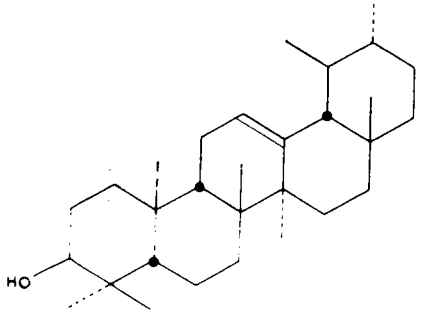
II-2 taraxérol



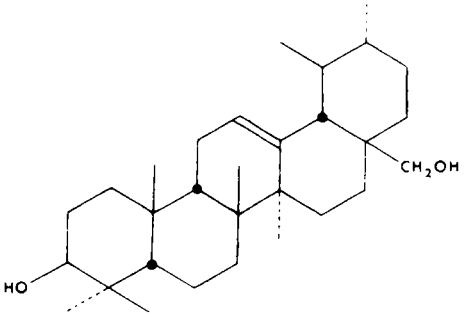
II-5 taraxérone



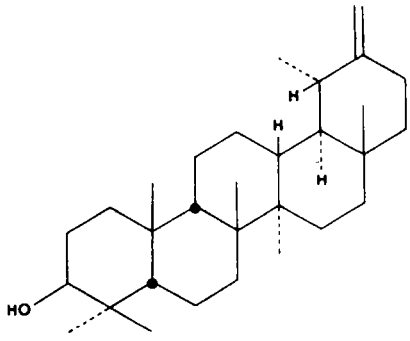
III-2 β-amyrine



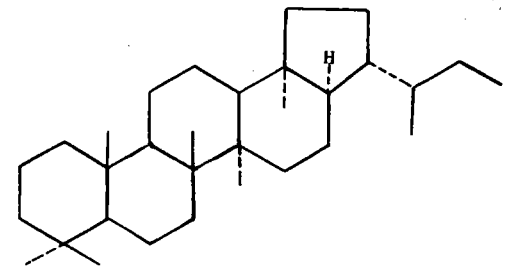
IV-2 α-amyrine



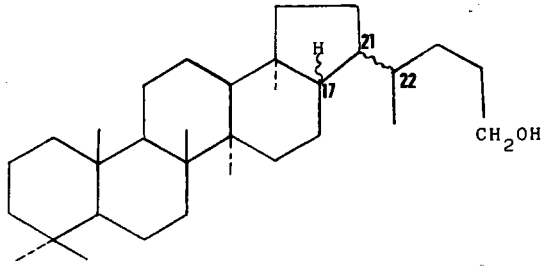
IV-5 uvaol



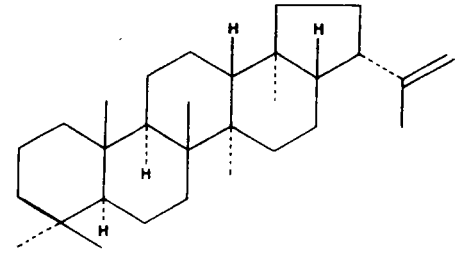
VI-2 - taraxastérol



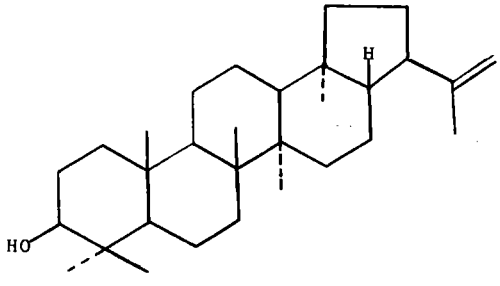
VIII-2 30-homohopane(17 αH-21βH)



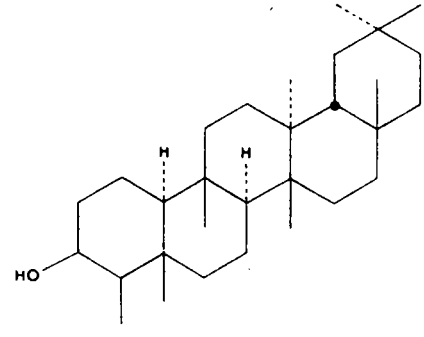
VIII-3 C_{32}-hopanol



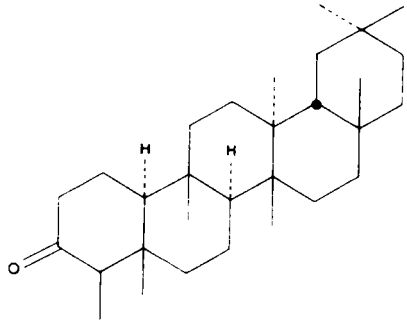
VIII-4 hopène B



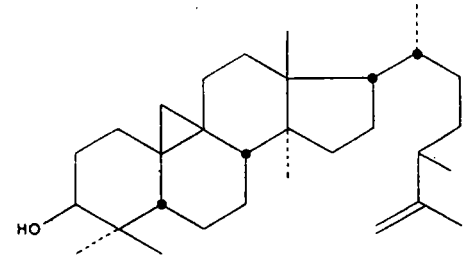
VIII-5 moréténol



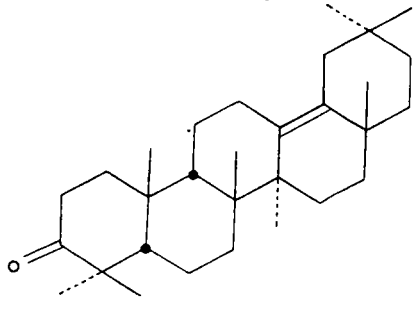
IX-2 épi-friedelanol



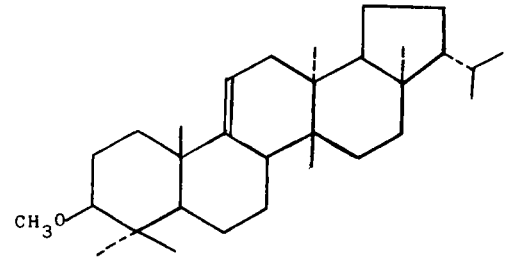
IX-4 friedeline



XIII-1 cyclolaudénol



XV Δ13-18 oléanène 3-one



XVI fernénol méthyl éther

caractéristiques précises, d'autant plus qu'il peut y avoir des dégradations thermiques plus ou moins importantes. Signalons qu'il apparait deux séries d'ions pour des m/z très élevées entre 185 °C et 250 °C:

$$m/z = 14n + 62 \text{ et } m/z = 14(n-1) + 44 \text{ avec } 43 < n < 57.$$

La figure 102 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 sans ambiguïté. En effet, les substances correspondantes sont présentes en trop faible quantité et se volatilisent pendant un temps trop court pour que la mesure de la masse exacte soit possible.

Nous pensons cependant que la première série d'ions correspond aux pics moléculaires d'esters résiduels d'acides gras et d'hydroxy-acides

$$CH_3 - (CH_2)_x - COO - (CH_2)_y - COOCH_3,$$

tandis que la deuxième série correspond aux ions M-32 (élimination de méthanol).

Le courant ionique total collecté passe par un maximum vers 90 °C, c'est-à-dire lors de la volatilisation de la plus grande partie des esters méthyliques des acides gras, puis il décroît lorsque la température du dispositif d'introduction augmente (fig. 103). 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.

Les spectres de masse par introduction directe de la cire brute Fb permettent de mettre en évidence les pics moléculaires d'acides gras libres de C16 à C34 et d'esters d'acides gras et d'alcools gras (cérides), de masse molaire 648 à 760, soit de 44 à 52 atomes de carbone. Ces pics ne figurent pas dans la fraction acide puisque les cérides ont été saponifiés.

L'étude des échantillons dégradés par voie chimique (action de HI en tube scellé à 220 °C, traitement par $CH_3CO_3H - HIO_4$) ne nous a fourni aucun renseignement supplémentaire.

De même, les spectres obtenus à partir de la fraction A séparée par CPG et de masse molaire 800-1000, ne permet pas de

mettre en évidence de pics moléculaires dans ce domaine de masse, à cause du bruit de fond important, ni de fragments caractéristiques.

X- IONISATION CHIMIQUE.

L'introduction directe de l'échantillon par désorption thermique suivie d'une ionisation chimique (gaz réactant CH_4) permet la production d'ions quasi-moléculaires et de peu de fragments. On peut donc s'attendre à obtenir des spectres de masse plus simples et plus faciles à interpréter que ceux obtenus par ionisation électronique.

Dans ces conditions les acides gras méthylés ou non donnent naissance aux ions MH^+, les hydroxy-acides aux ions MH^+ et MH^+-H_2O. La figure 104 représente un des spectres obtenus à partir de l'échantillon Fa non méthylé. On reconnait effectivement les ions MH^+ des acides gras: 369 (C24), 397 (C26), 425 (C28), 471 (acide C32-hopanoïque); les ions MH^+-H_2O des hydroxy-acides: 311 (C20), 339 (C22), 367 (C24), 395 (C26). Des résultats analogues sont obtenus avec la fraction acide méthylée de l'échantillon V1a (tourbe de Vitrimont) (fig. 105). On observe les pics quasi-moléculaires des esters méthyliques des acides gras: 355 (C22), 383 (C24), 411 (C26), 439 (C28), 467 (C30); ceux des hydroxy-acides: 371 (C22), 399 (C24), 427 (C26), 455 (C28), 483 (C30) et les ions MH^+-H_2O correspondants.

Par contre aucun ion intéressant n'émerge du bruit de fond dans la région $m/z > 500$. Le rendement d'ionisation des produits lourds est sans doute trop faible pour donner un spectre intéressant.

XI- IONISATION PAR IMPACT LASER (LAMMA)*.

La volatilisation de l'échantillon et l'ionisation des molécules sont réalisées grâce à l'impact d'un faisceau laser d'énergie réglable. Dans ces conditions les acides gras libres donnent naissance à des ions négatifs $R-COO^-$ (M-1). On observe effectivement ces ions dans le spectre d'un mélange témoin d'acides gras de C16 à C30 que nous avons réalisé, les

* Service commun LAMMA de l'Université de Metz.

hauteurs des pics étant sensiblement proportionnelles aux concentrations des acides gras correspondants dans le mélange.

Malheureusement les résultats obtenus avec divers échantillons de nos cires sont entièrement négatifs. Cette technique, essentiellement applicable aux substances minérales, ne nous a pas permis de retrouver les acides gras identifiés par CPV ou spectrométrie de masse classique, ni de mettre en évidence d'autres ions intéressants.

XII- CONCLUSION.

La technique de couplage CPV-spectrométrie de masse nous a permis de confirmer la structure linéaire des acides gras, d'identifier des α-ω diacides, de mettre en évidence des ω-hydroxy-acides de C16 à C28 et de les caractériser par leurs spectres sous forme d'esters méthyliques silylés et d'α-ω diols bis-TMSi éthers.

Par ailleurs, dans les diverses fractions insaponifiables, nous avons identifié des n-alcanes, des alcools gras, des stérols et des triterpénoïdes. Nous avons proposé, dans la mesure du possible, une structure pour ces composés, d'après les données disponibles dans la littérature.

La spectrométrie de masse par introduction directe (ionisation électronique, chimique ou laser) ne nous a pas permis de caractériser les substances de masses molaires élevées non volatiles en CPV, ceci probablement à cause d'un trop faible rendement d'ionisation et également à cause de leur faible volatilité.

La technique d'ionisation par désorption de champ, qui serait applicable aux substances de masses molaires élevées, pourrait peut-être permettre de résoudre ce problème.

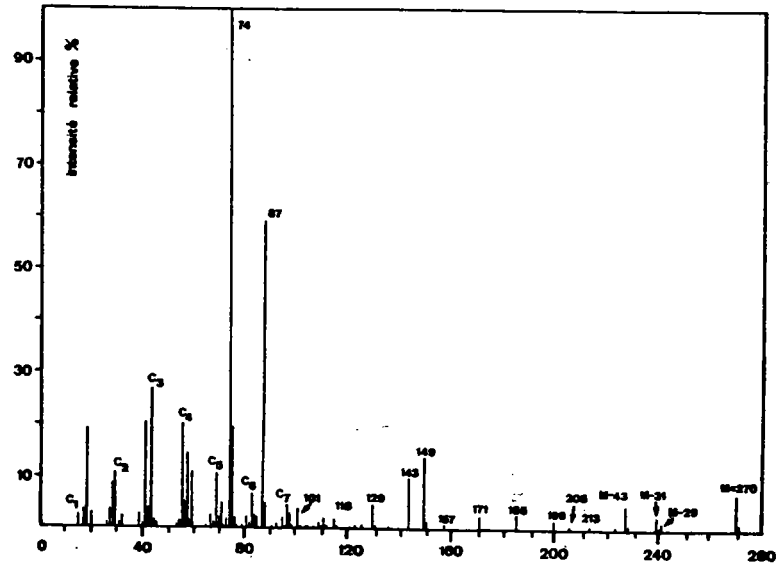


Fig. 46: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C16 (M = 270).

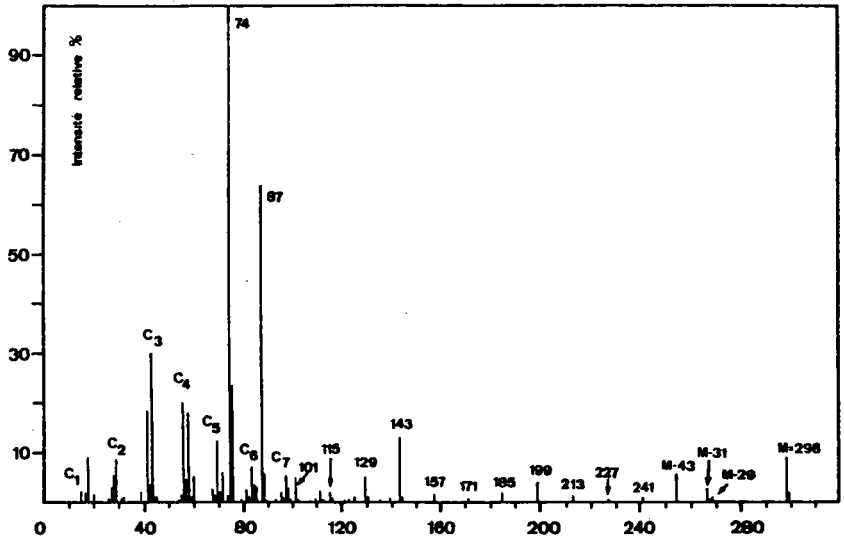


Fig. 47: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C18 (M = 298).

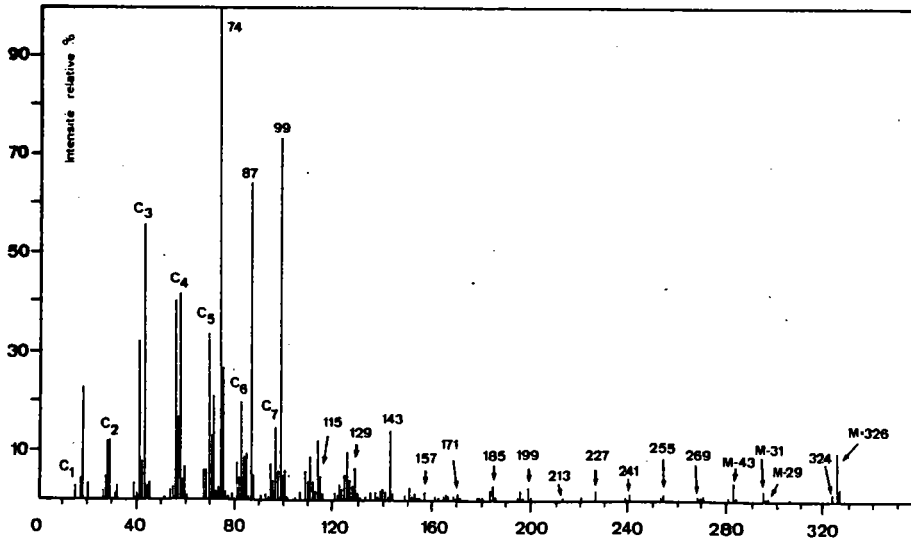


Fig. 48: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C20 (M = 326).

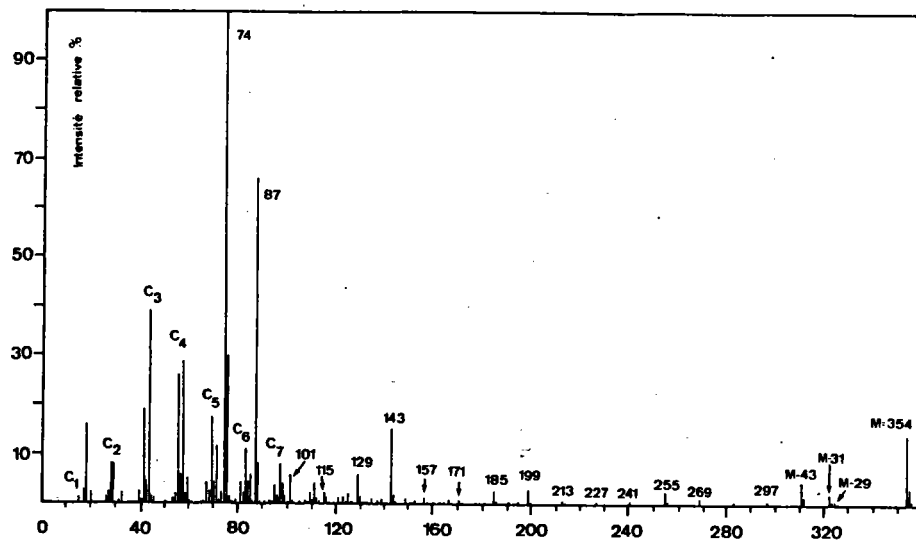


Fig. 49: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C22 (M = 354).

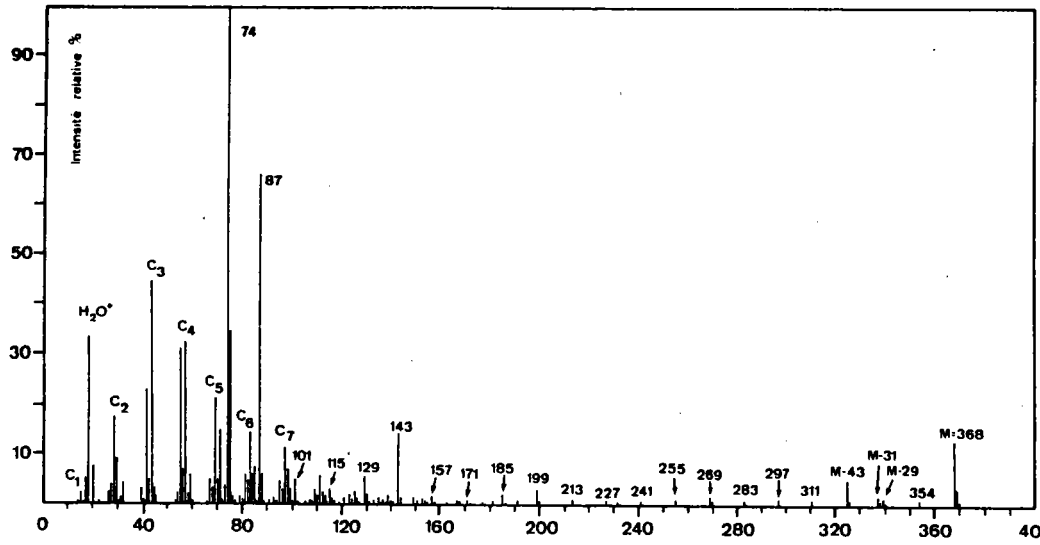


Fig. 50: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C23 (M = 368).

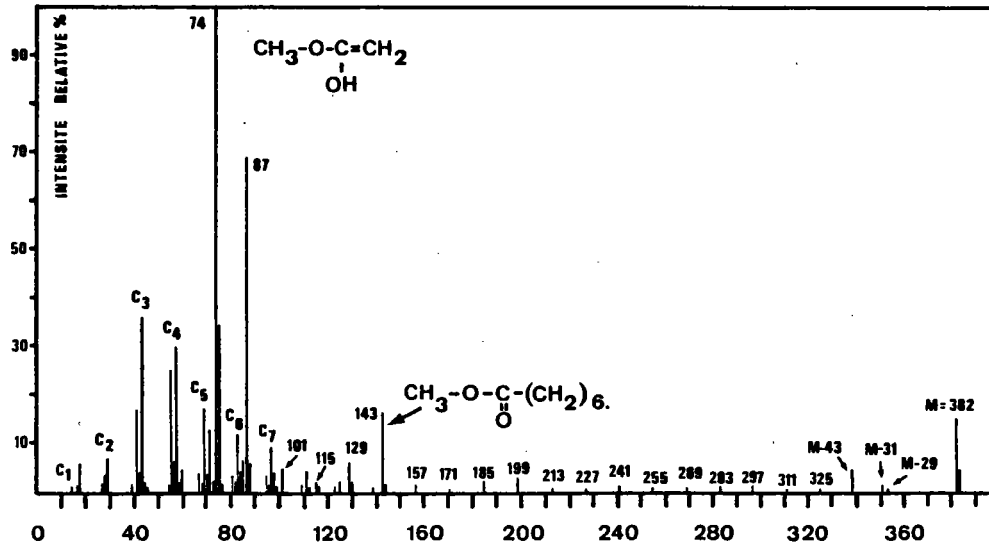


Fig. 51: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C24 (M = 382).

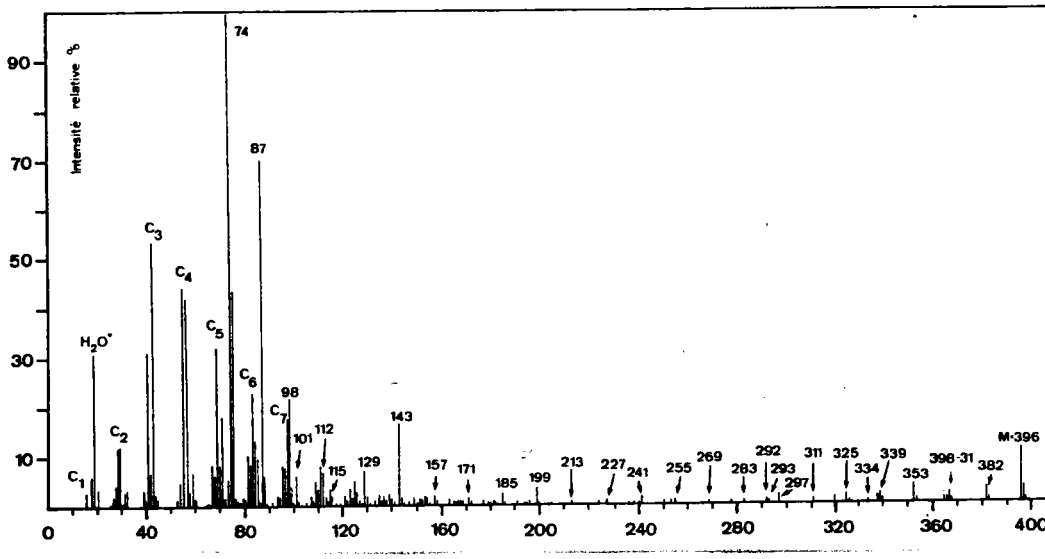


Fig. 52: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C25 (M = 396).

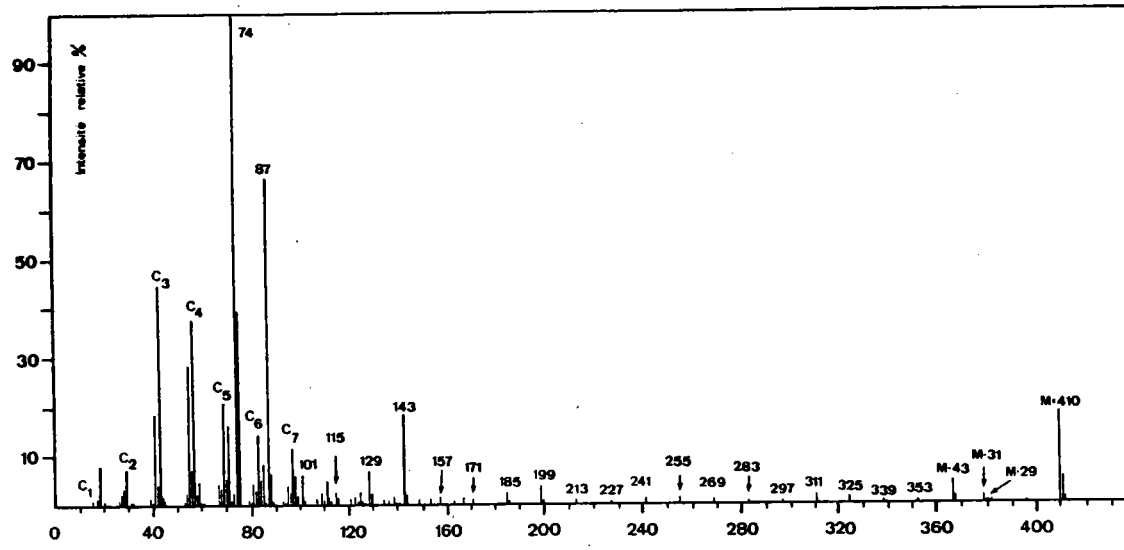


Fig. 53: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C26 (M = 410).

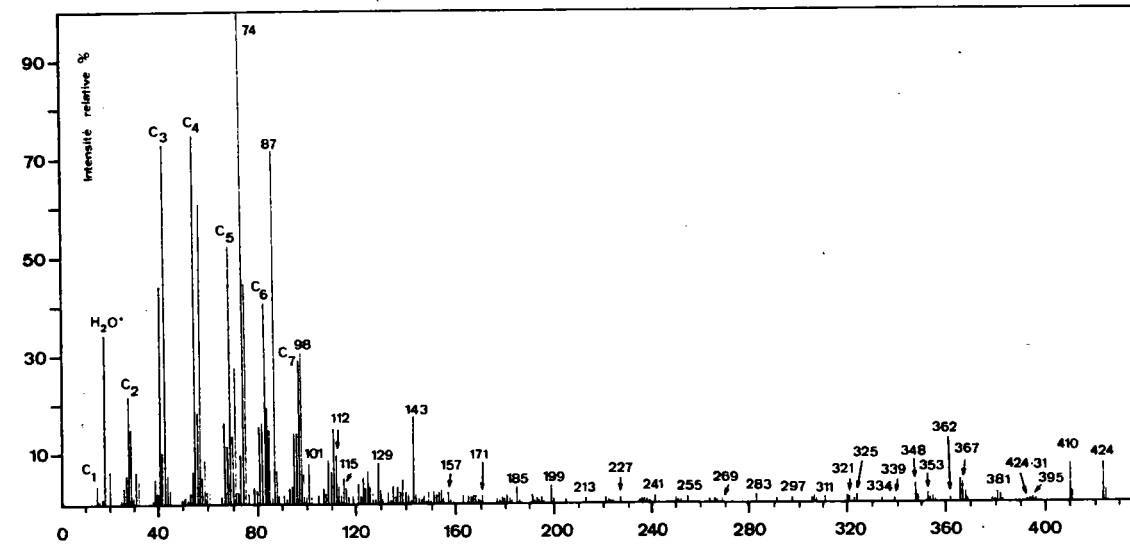


Fig. 54: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C27 (M = 424).

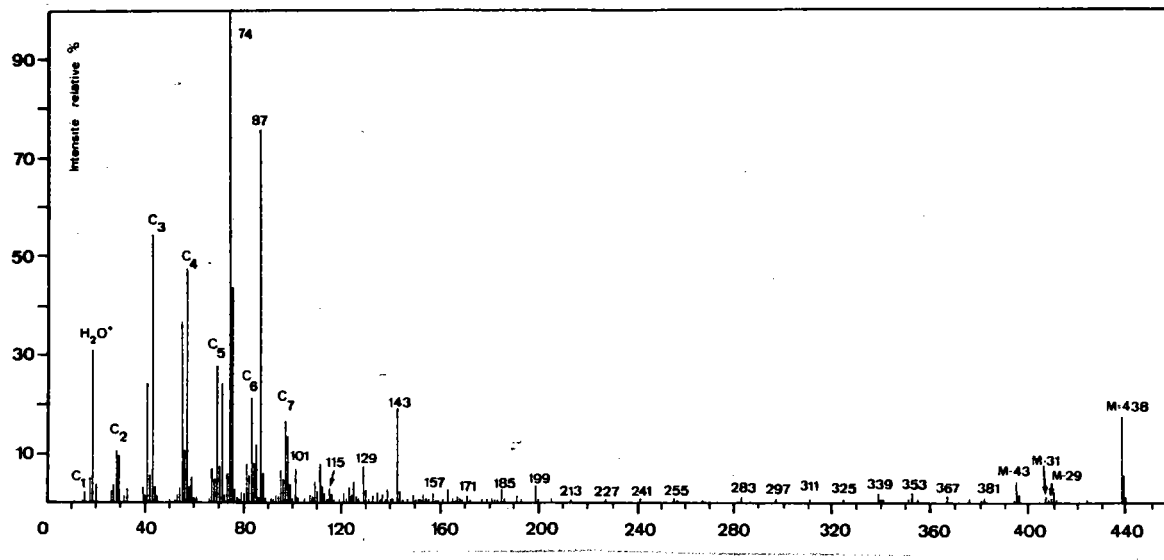


Fig. 55: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C28 (M = 438).

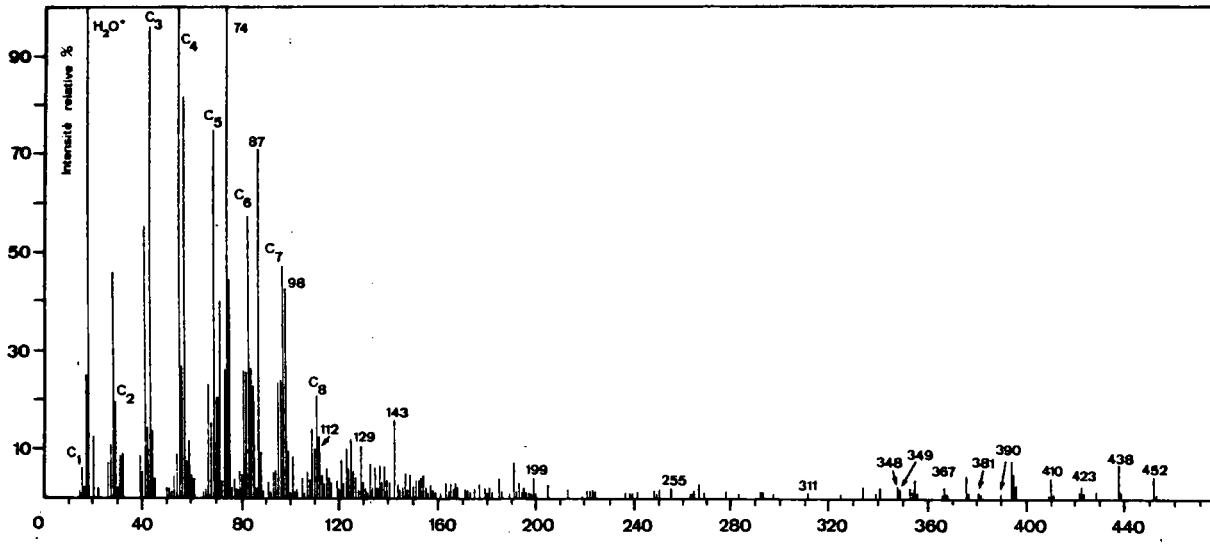


Fig. 56: Analyse des esters méthyliques des acides gras de la fraction acide Fa méthylée par couplage CPV-SM: terme en C29 (M = 452).

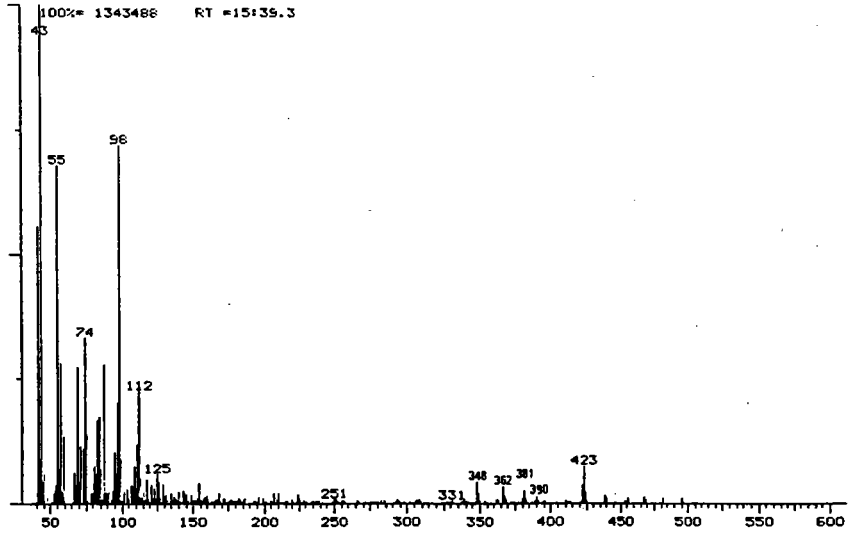


Fig. 57: Spectre de masse de l'ester diméthylique de l'acide hexacosanedioïque (pic 26 fig. 33), M = 454.

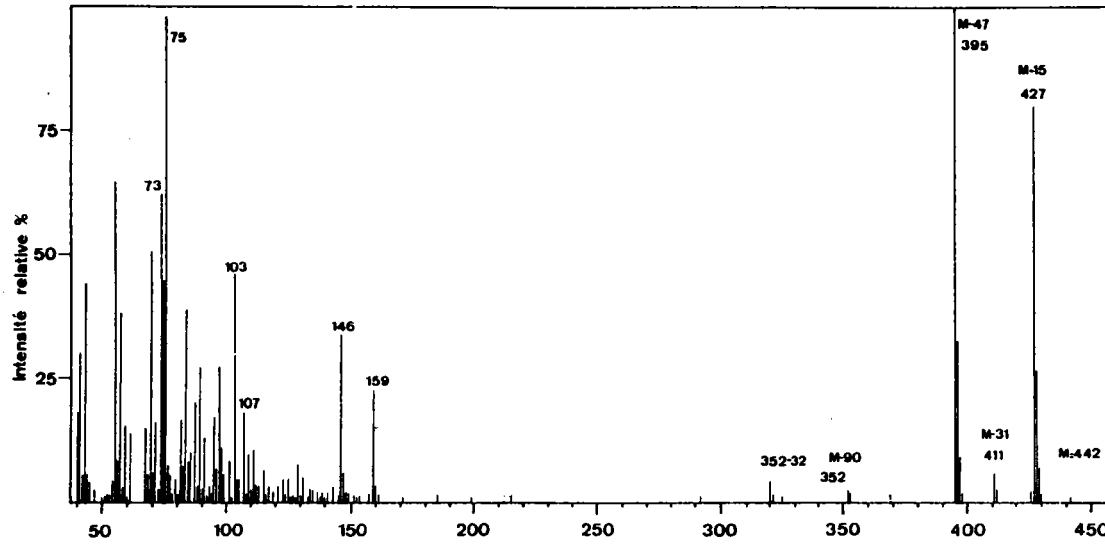


Fig. 58: Spectre de masse du 22-hydroxy-docosanoate de méthyle TMSi éther obtenu à partir de la fraction acide Fa par couplage CPV-SM (M = 442).

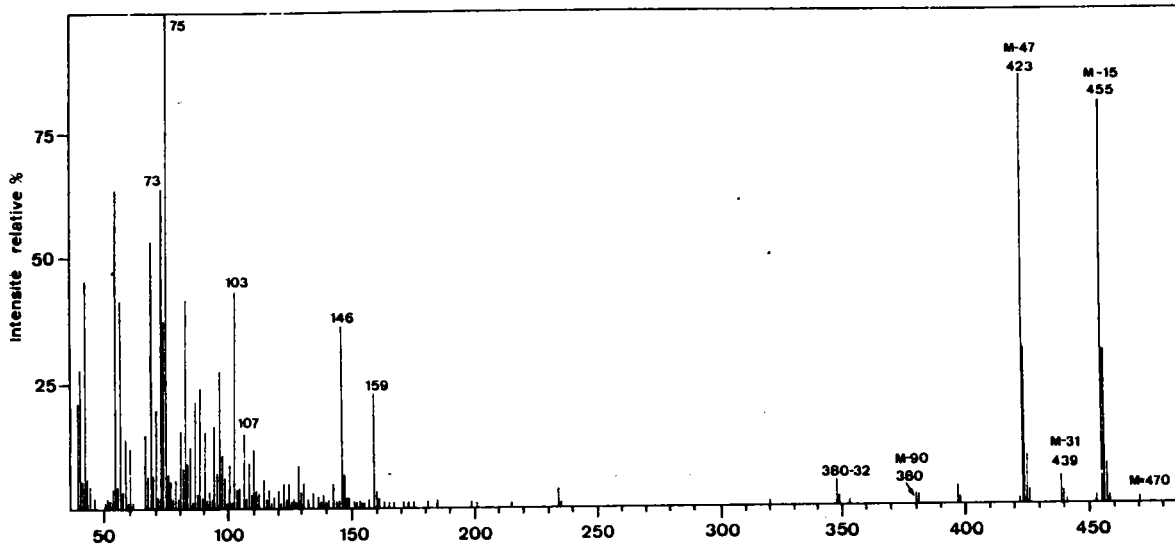


Fig. 59: Spectre de masse du 24-hydroxy-tétracosanoate de méthyle TMSi éther obtenu à partir de la fraction acide Fa par couplage CPV-SM (M = 470).

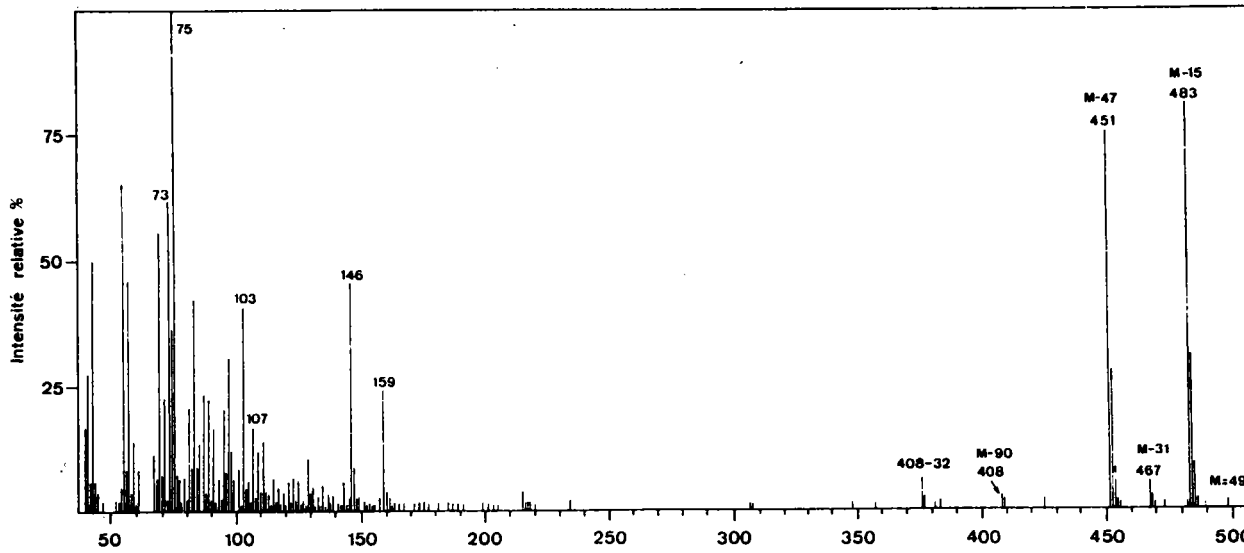


Fig. 60: Spectre de masse du 26-hydroxy-hexacosanoate de méthyle TMSi éther obtenu à partir de la fraction acide Fa par couplage CPV-SM (M = 498).

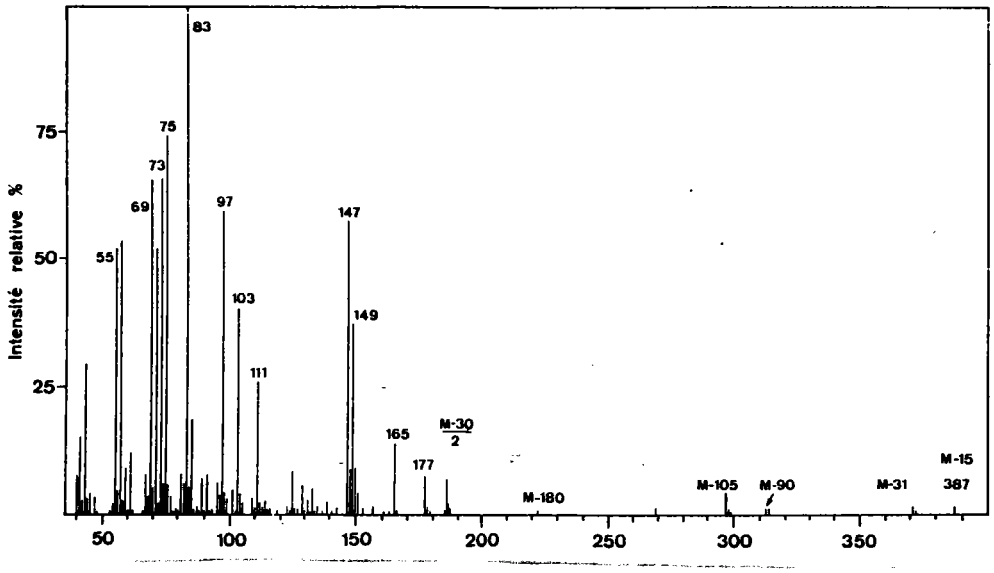


Fig. 61: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,16 hexadécanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far par couplage CPV-SM (M = 402).

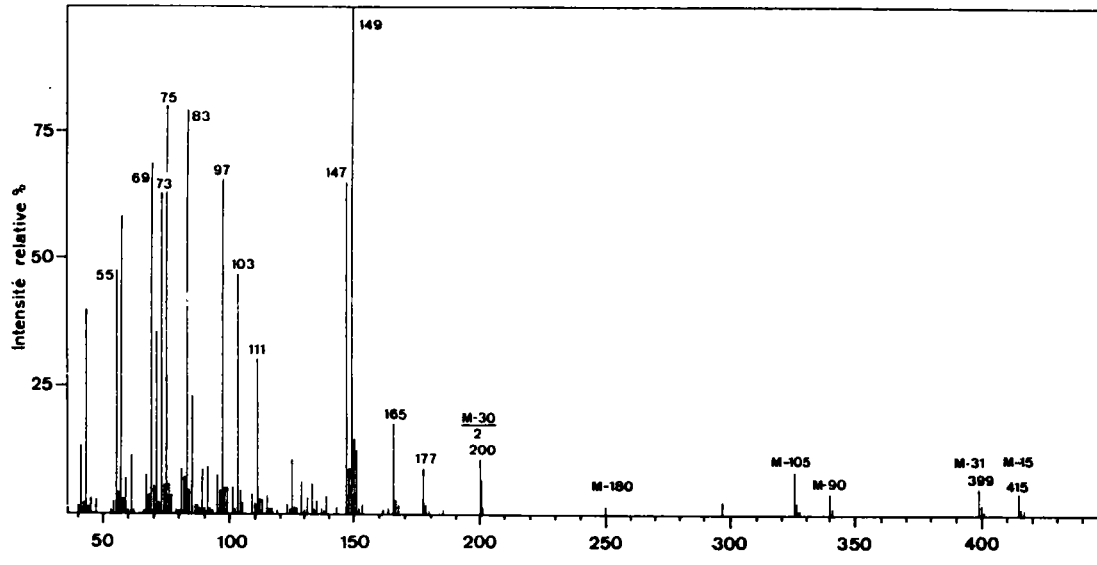


Fig. 62: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,18 octadécanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far par couplage CPV-SM (M = 430).

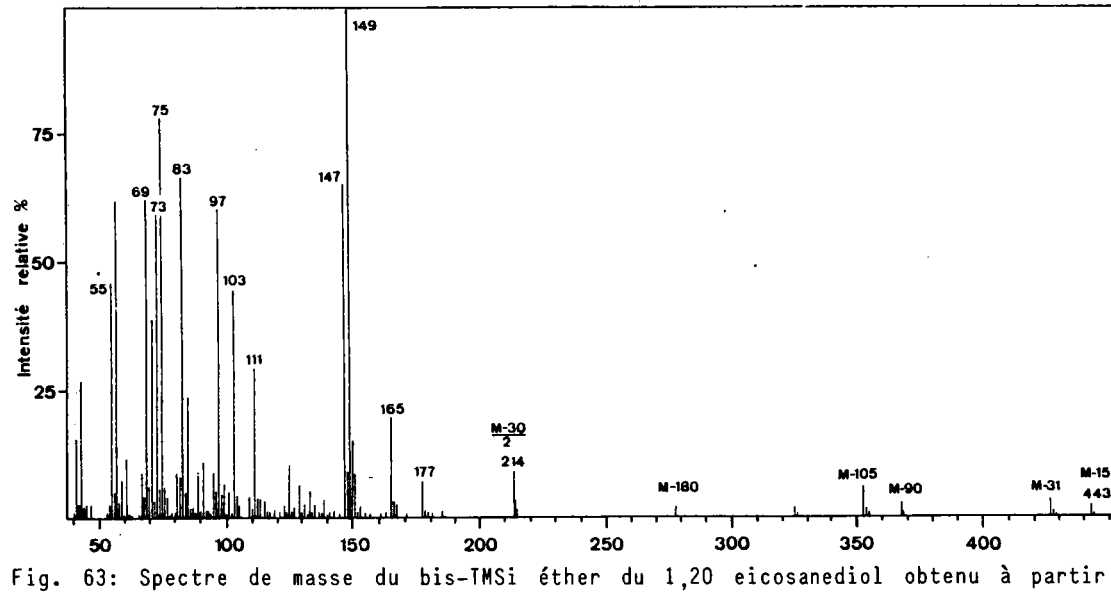


Fig. 63: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,20 eicosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far par couplage CPV-SM (M = 458).

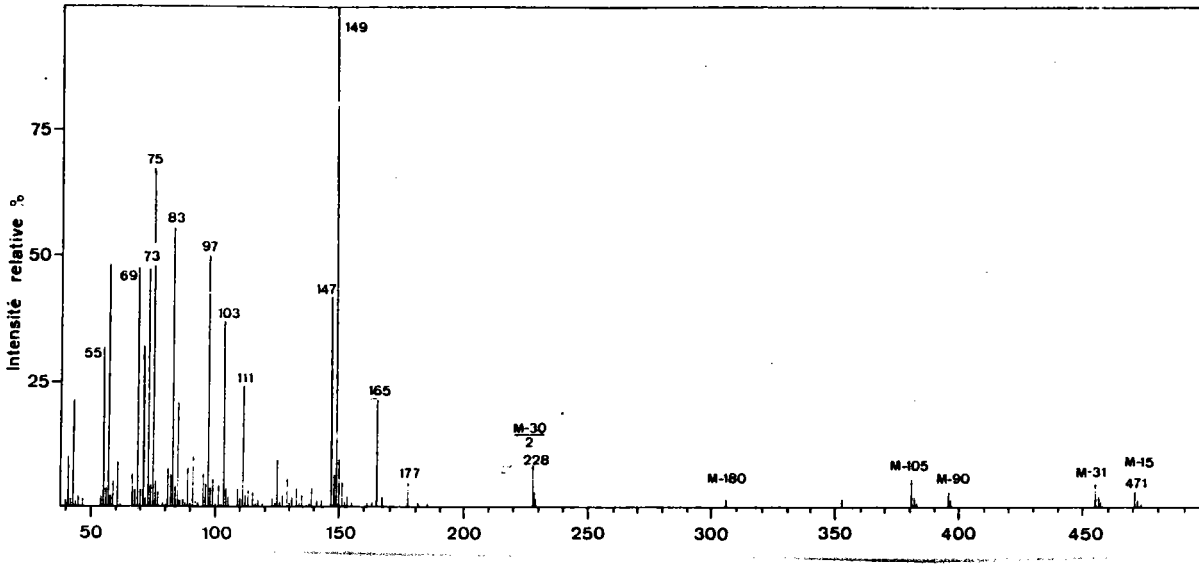


Fig. 64: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,22 docosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far (M = 486).

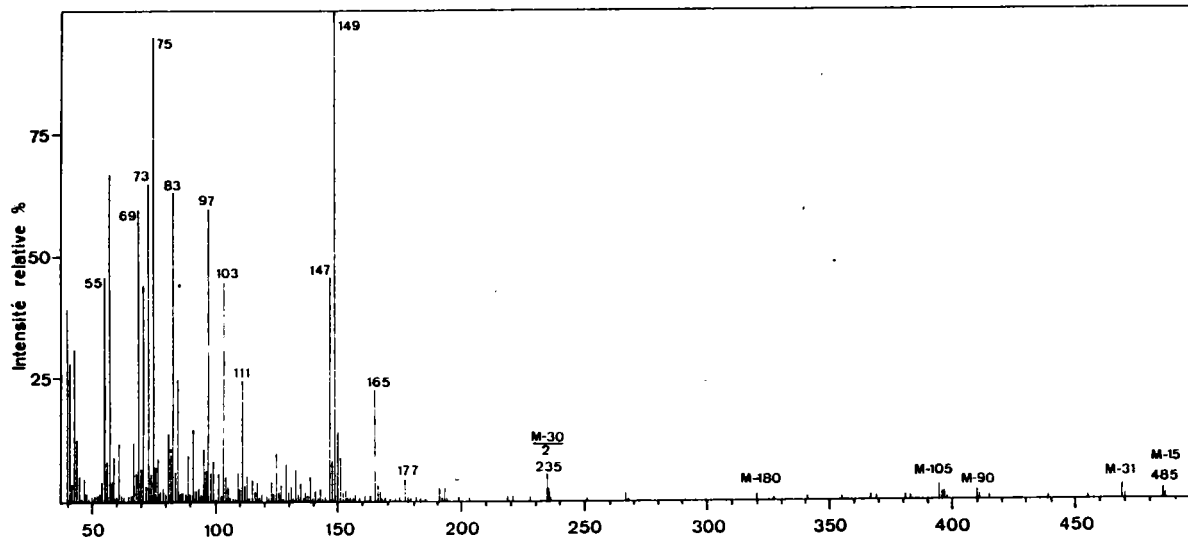


Fig. 65: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,23 tricosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far (M = 500).

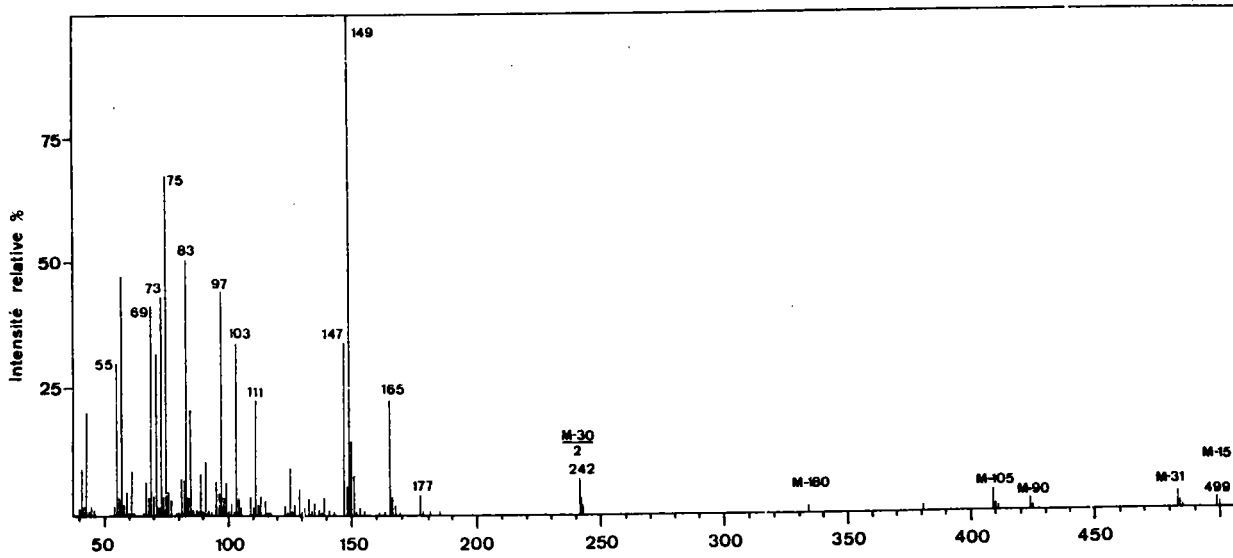


Fig. 66: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,24 tétracosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far (M = 514).

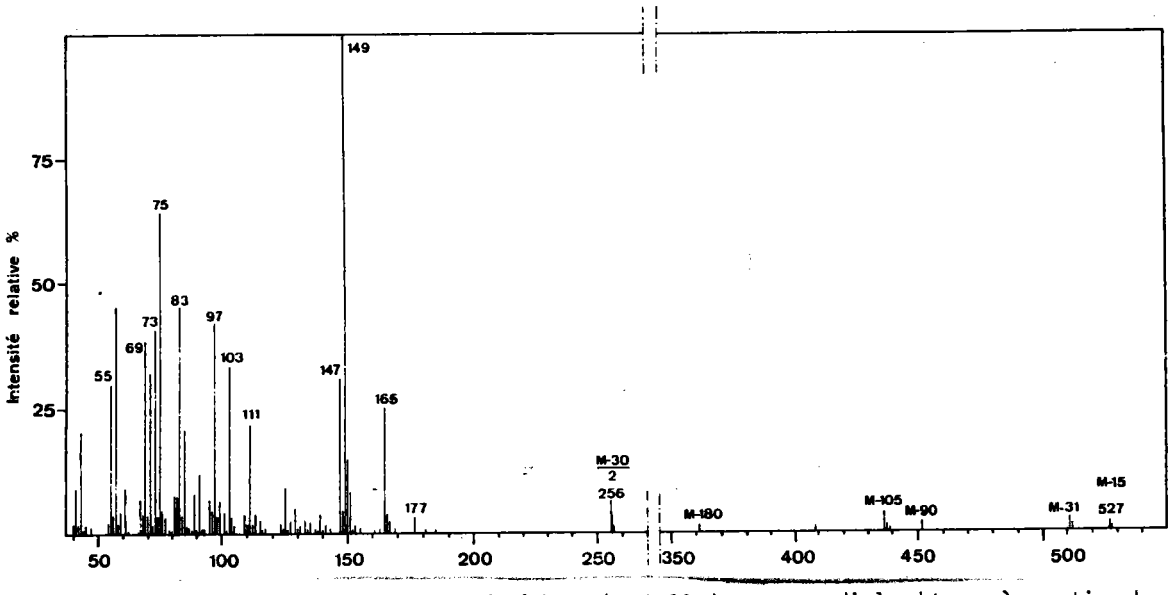


Fig. 67: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,26 hexacosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far (M = 542).

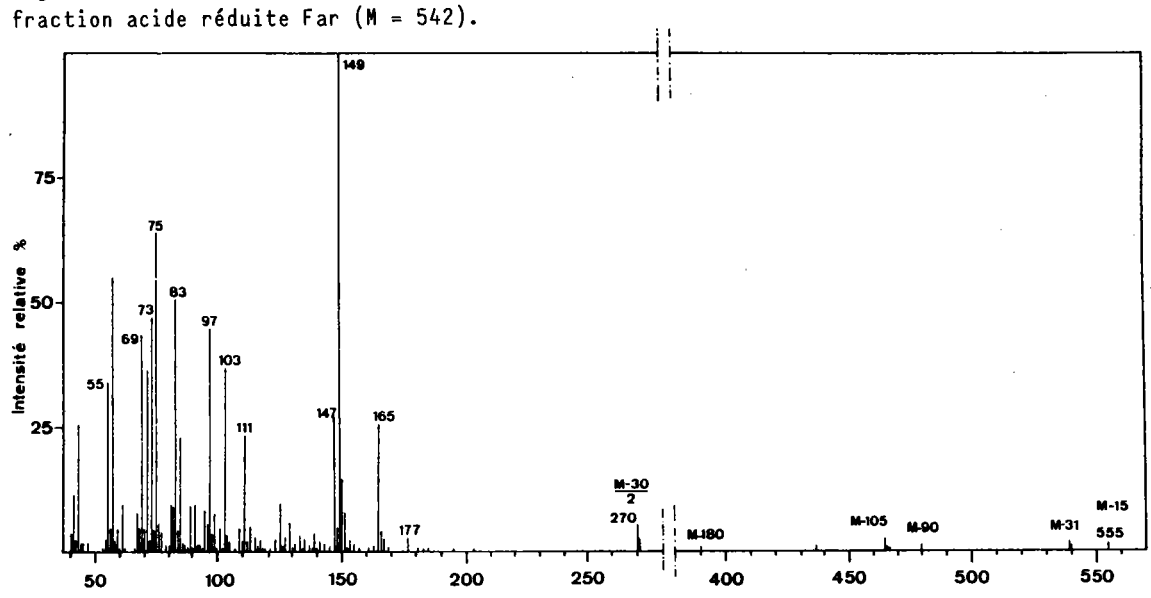


Fig. 68: Spectre de masse du bis-TMSi éther du 1,28 octacosanediol obtenu à partir de la fraction acide réduite Far (M = 570).

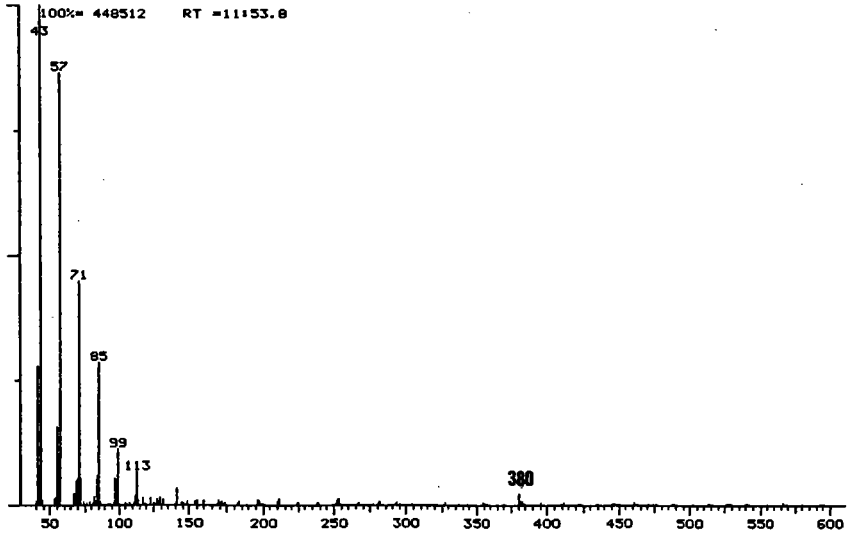


Fig. 69: Spectre de masse du n-heptacosane (M = 380) obtenu à partir de la fraction insaponifiable LOi (pic 9, fig. 37).

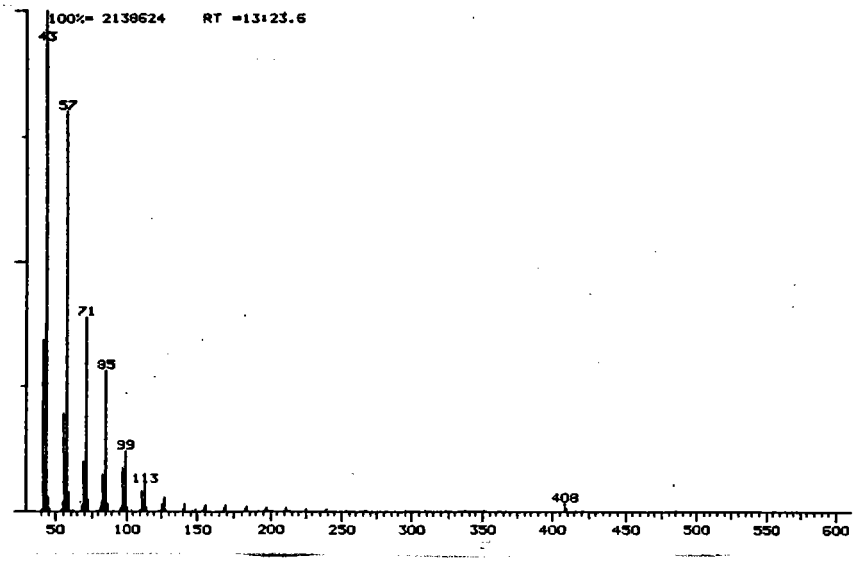


Fig. 70: Spectre de masse du n-nonacosane (M = 408) obtenu à partir de la fraction insaponifiable LOi (pic 12, fig. 37).

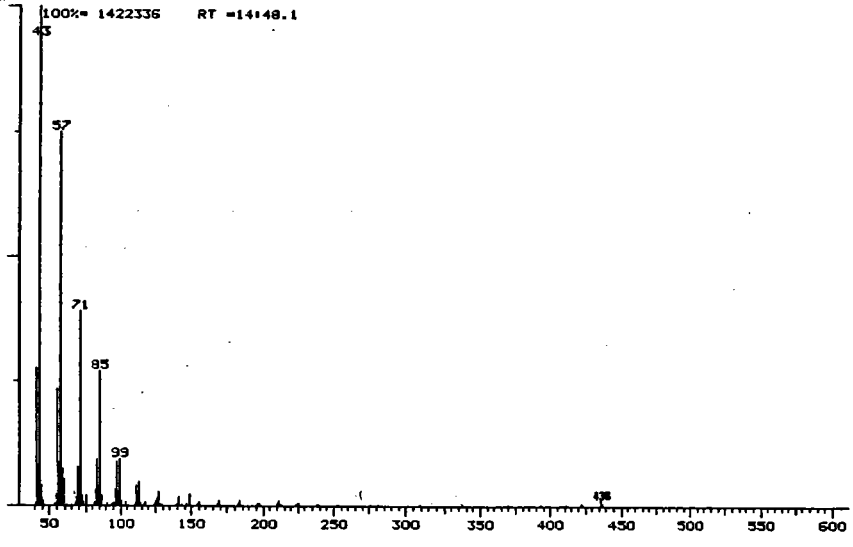


Fig. 71: Spectre de masse du n-hentriacontane (M = 436) obtenu à partir de la fraction insaponifiable LOi (pic 15, fig. 37).

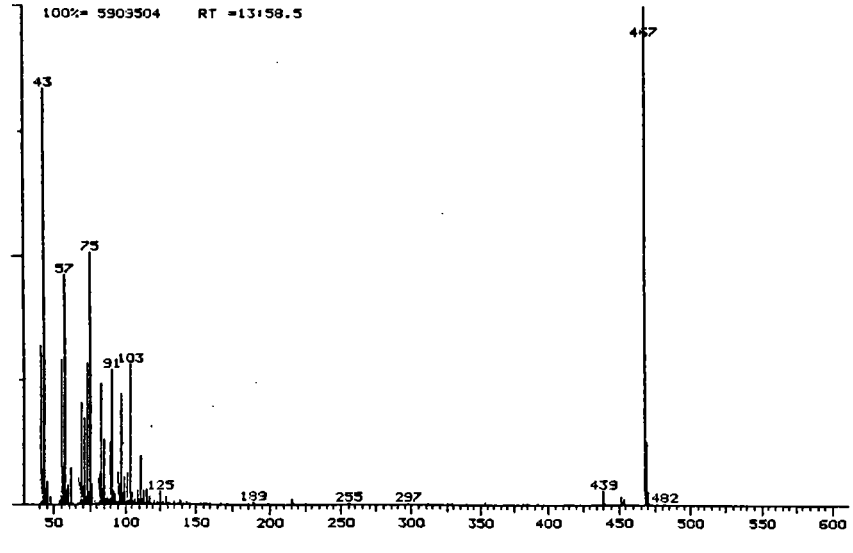


Fig. 72: Spectre de masse de l'éther TMSi du n-octacosanol (M = 482) obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi (pic 18, fig. 18 et 20).

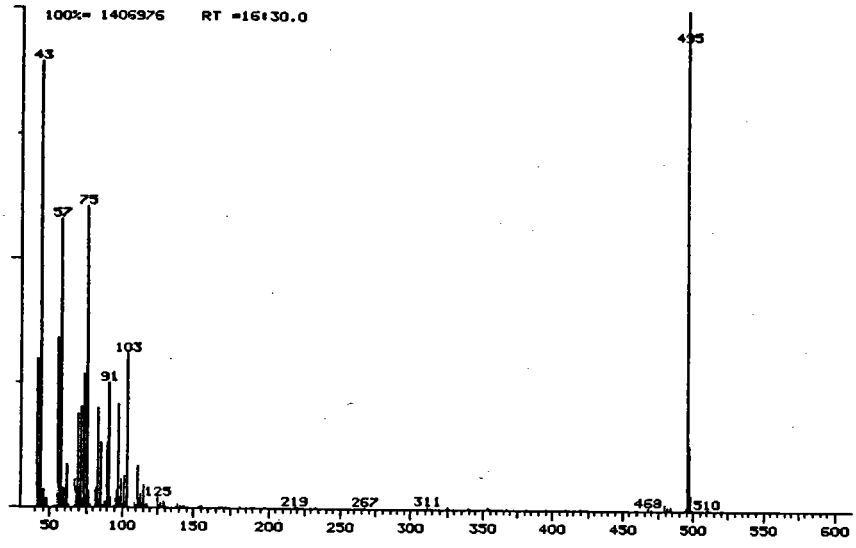


Fig. 73: Spectre de masse de l'éther TMSi du n-triacontanol (M = 510) obtenu à partir de la fraction insaponifiable LOi (pic 21, fig.37).

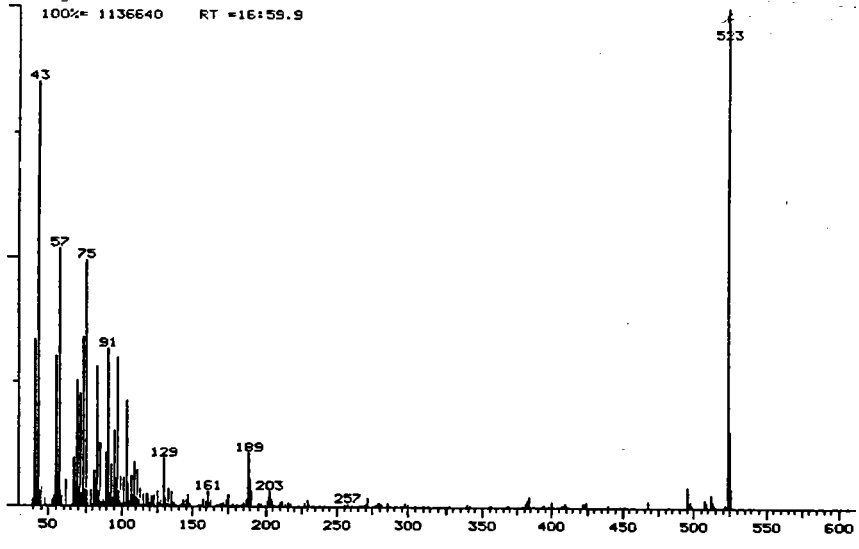


Fig. 74: Spectre de masse de l'éther TMSi du n-dotriacontanol (M = 538) obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi (pic 38, fig. 18 et 20).

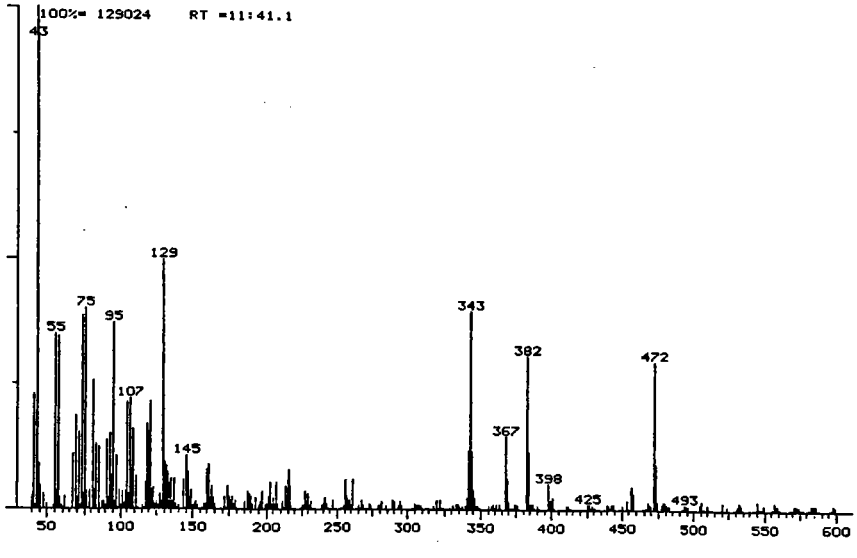


Fig. 75: Spectre de masse du stéroïde 1 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 39, fig. 21): campestérol TMSi éther (M = 472).

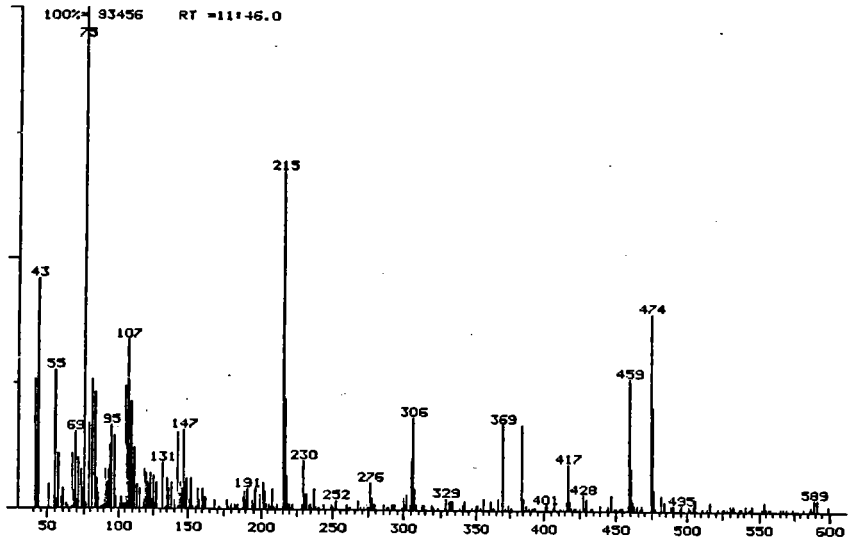


Fig. 76: Spectre de masse du stéroïde 2 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 40, fig. 21): campestanol TMSi éther (M = 474).

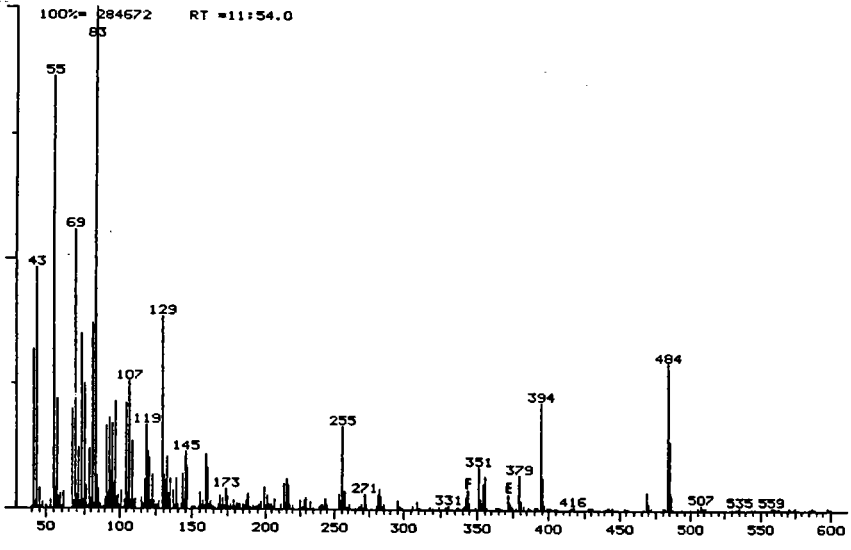


Fig. 77: Spectre de masse du stéroïde 3 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 41, fig. 21): stigmastérol TMSi éther (M = 484).

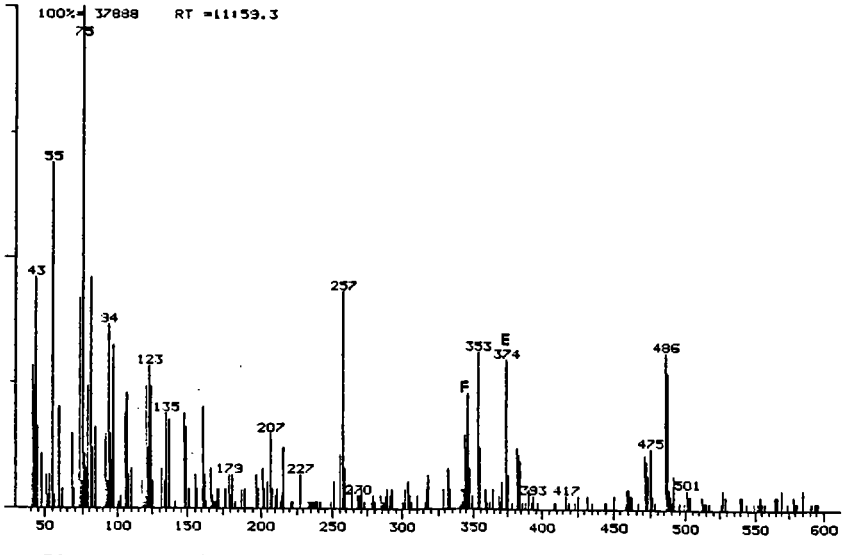


Fig. 78: Spectre de masse du stéroïde 4 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 42, fig. 21): stigmasta-22-ène-3-ol TMSi éther (M = 486).

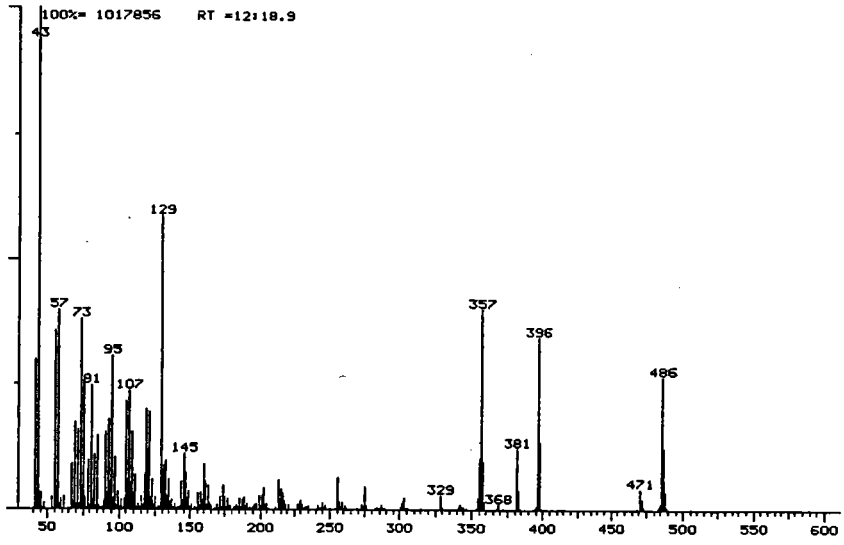


Fig. 79: Spectre de masse du stéroïde 5 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 43, fig. 21): β-sitostérol TMSi éther (M = 486).

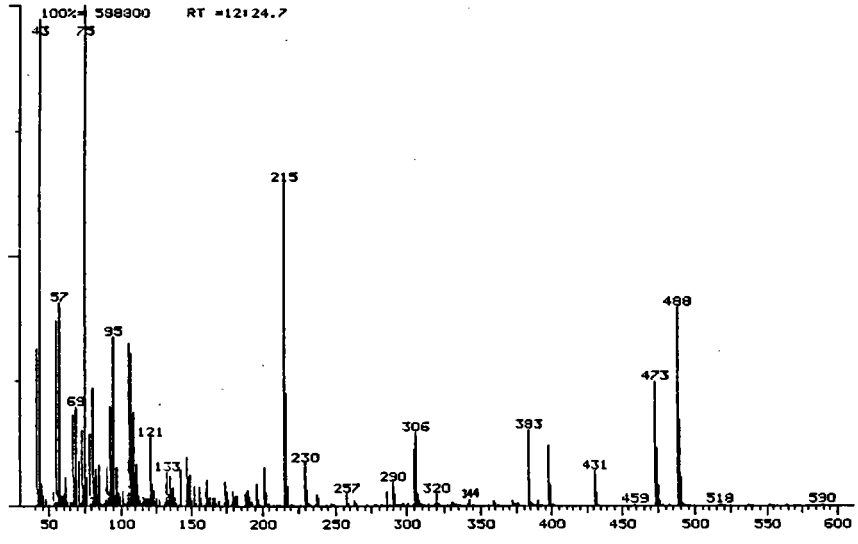


Fig. 80: Spectre de masse du stéroïde 6 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 44, fig. 21): β-stigmastanol TMSi éther (5αH)(M = 488).

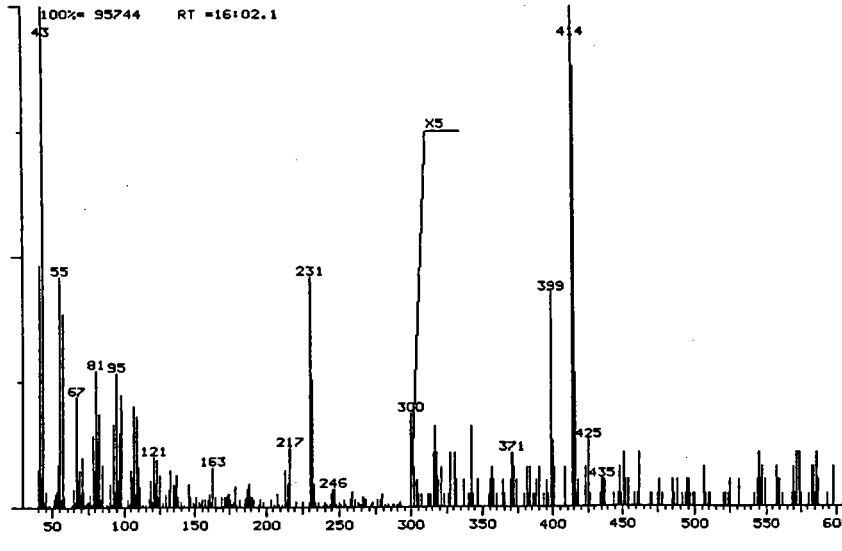


Fig. 81: Spectre de masse du stéroïde 7 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 23, fig. 19): 3-stigmastanone (M = 414).

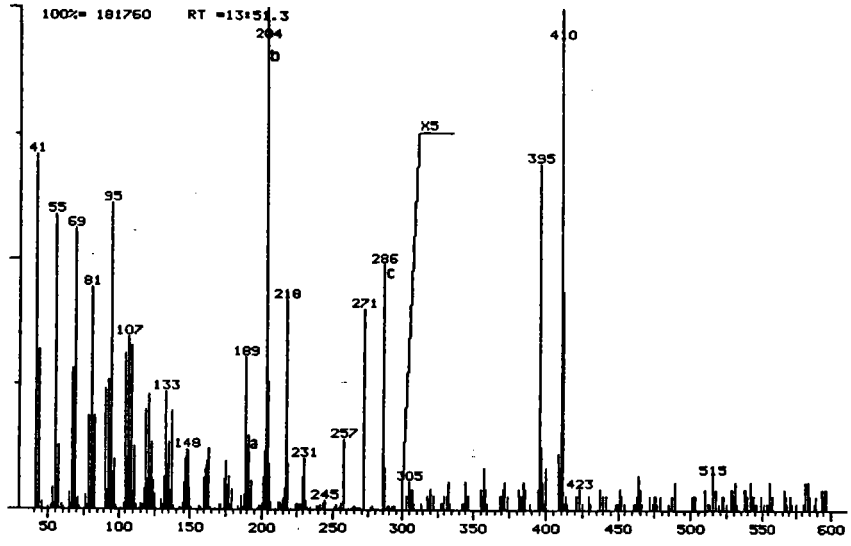


Fig. 82: Spectre de masse du triterpénoïde F1 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 15, fig. 19): taraxérène (M = 410).

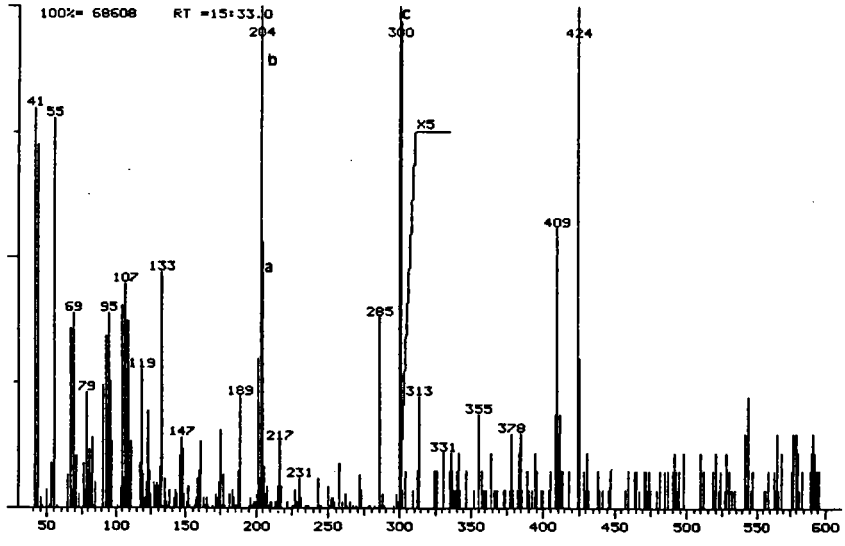


Fig. 83: Spectre de masse du triterpénoïde F4 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 21, fig. 19): taraxérone (M = 424).

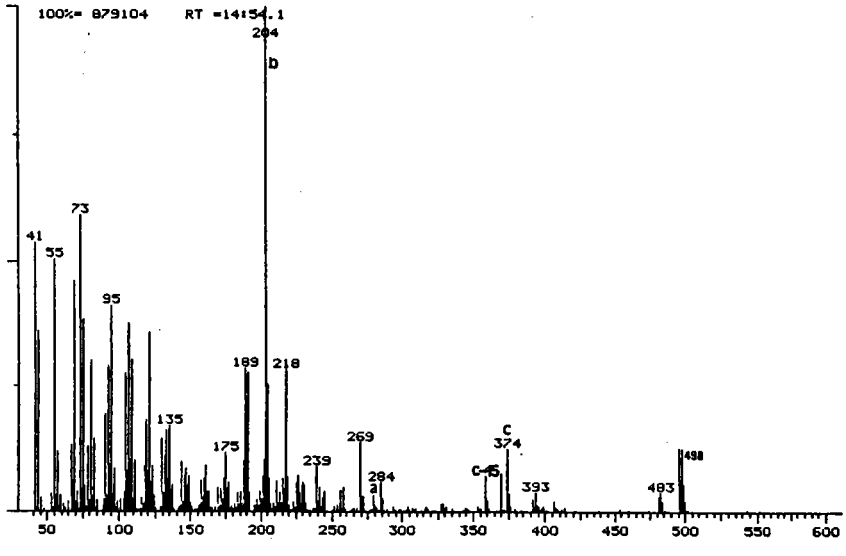


Fig. 84: Spectre de masse du triterpénoïde F9 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 29, fig. 20): taraxérol TMSi éther (M = 498).

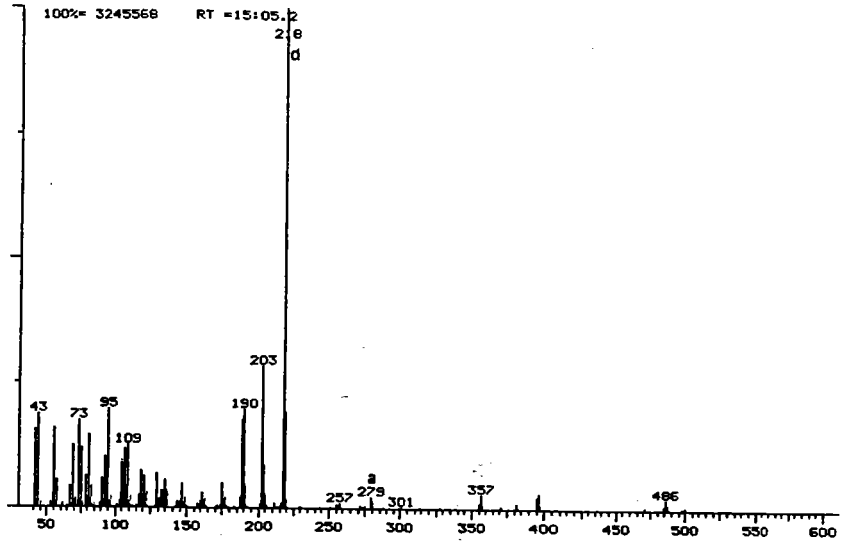


Fig. 85: Spectre de masse du triterpénoïde F10 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 30, fig. 20): β-amyrine TMSi éther (M = 498).

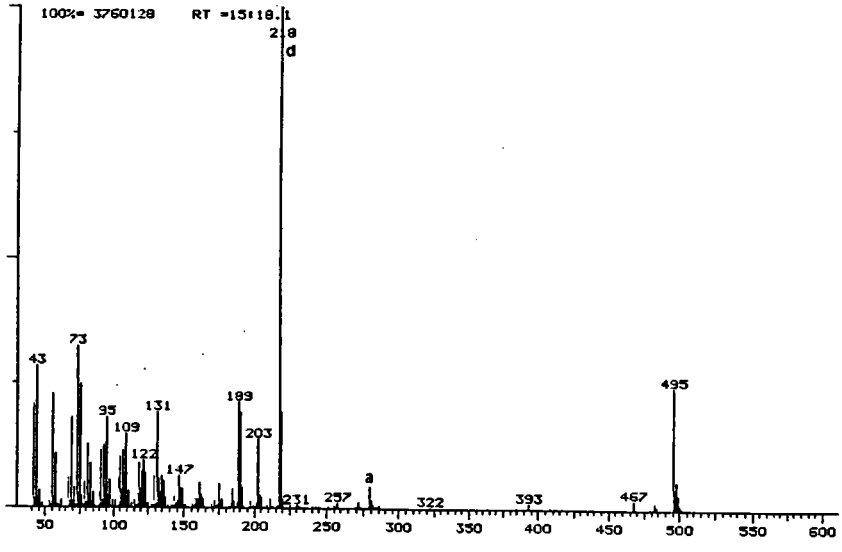


Fig. 86: Spectre de masse du triterpénoïde F11 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 31, fig. 20): α-amyrine TMSi éther (M = 498).

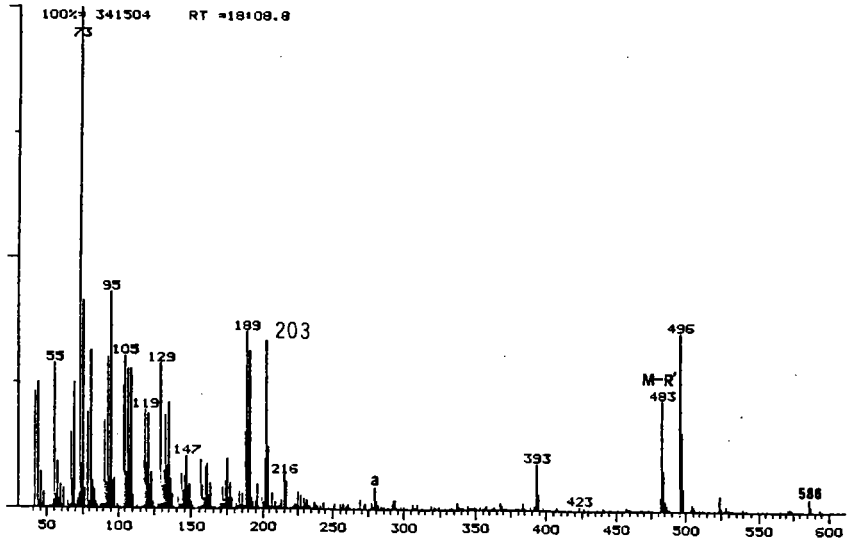


Fig. 87: Spectre de masse du triterpénoïde V3 obtenu à partir de la fraction insaponifiable VOi par couplage CPV-SM (pic 25, fig. 28): uvaol bis TMSi éther (M = 586).

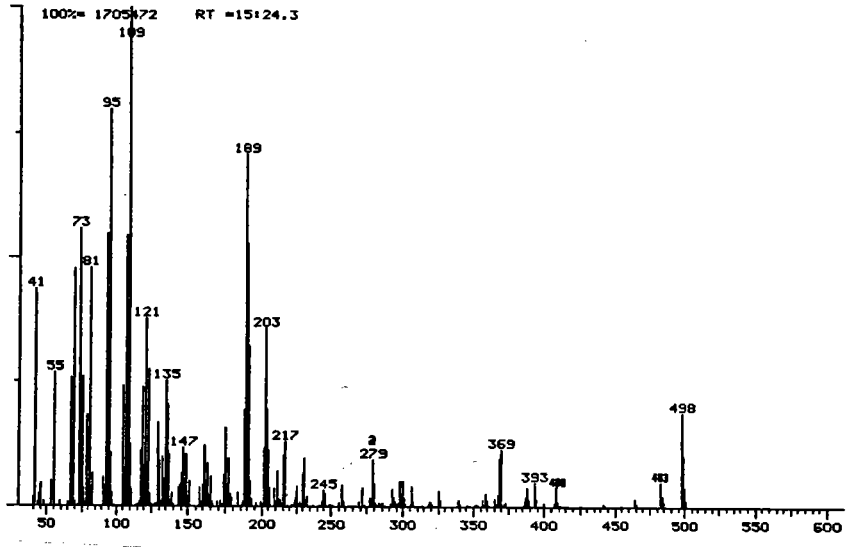


Fig. 88: Spectre de masse du triterpénoïde F12 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 33, fig. 20): taraxastérol TMSi éther (M = 498).

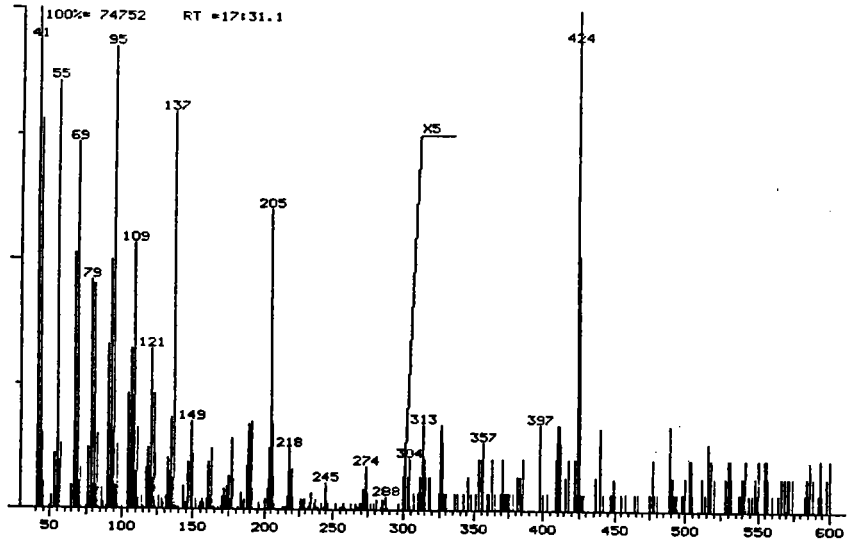


Fig. 89: Spectre de masse du triterpénoïde F8 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 27, fig. 19): $C_{30}H_{48}O$ (M = 424).

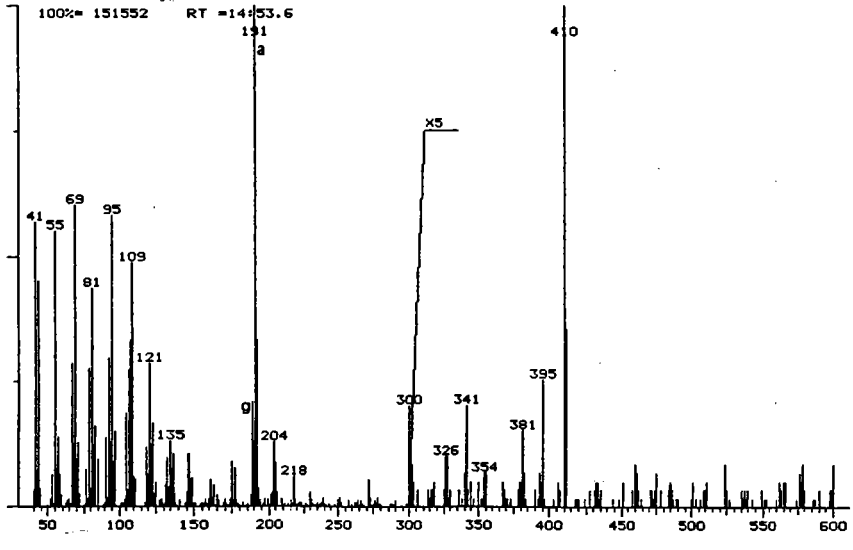


Fig. 90: Spectre de masse du triterpénoïde F2 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 19, fig. 19): hopène B (M = 410).

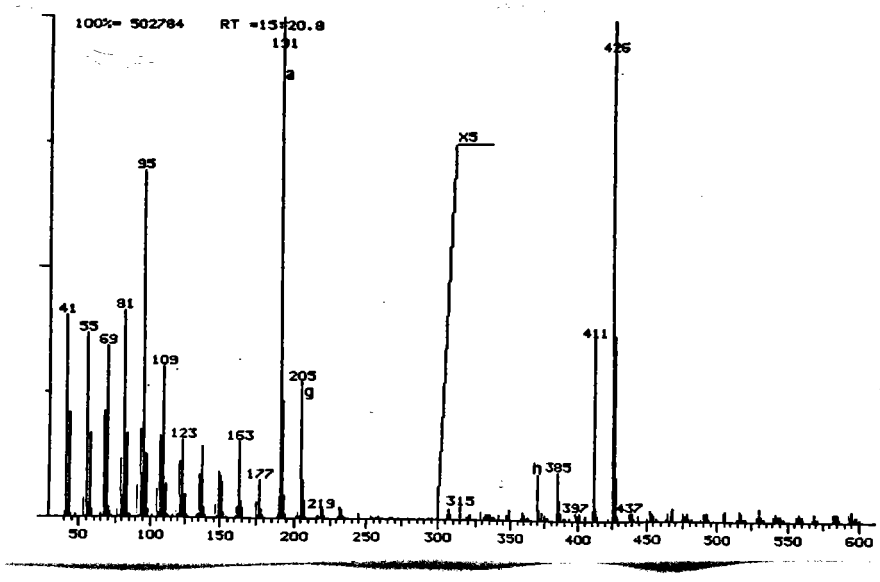


Fig. 91: Spectre de masse du triterpénoïde F3 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 20, fig. 19): 30-homo-hopane (17α H-21β H) (M = 426).

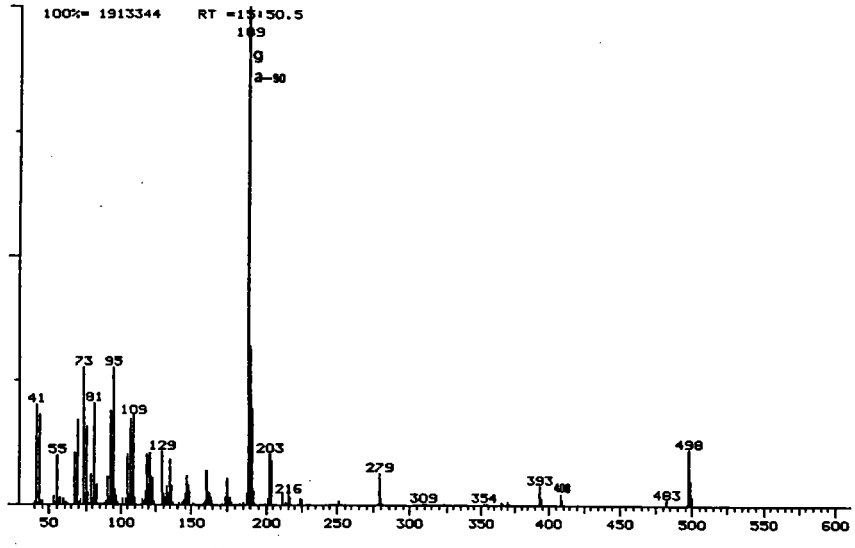


Fig. 92: Spectre de masse du triterpénoïde F14 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 35, fig. 20): moréténol TMSi éther (M = 498).

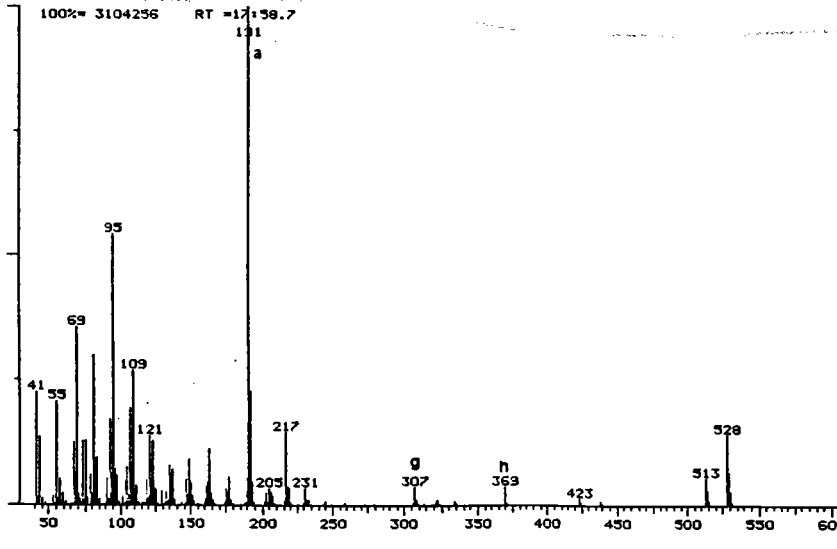


Fig. 93: Spectre de masse du triterpénoïde F17 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 45, fig. 20): C32-hopanol TMSi éther (17α H-21β H) (M = 528).

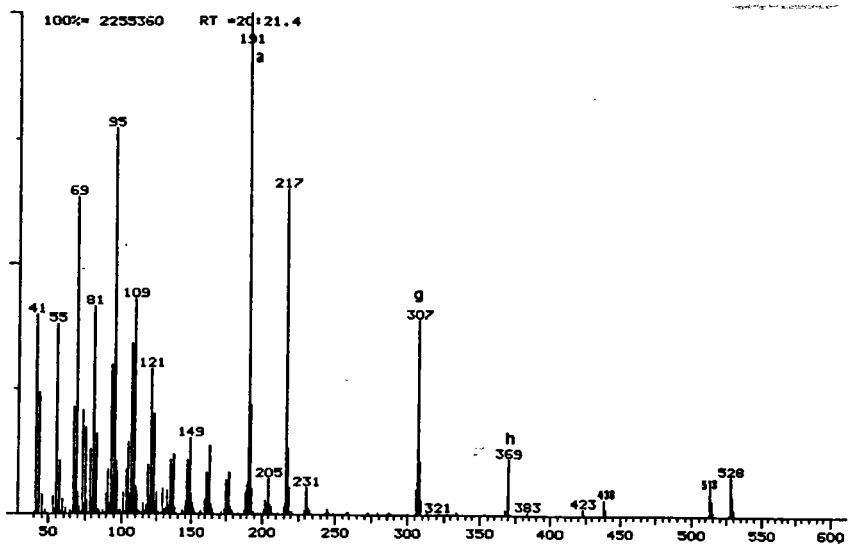


Fig. 94: Spectre de masse du triterpénoïde F18 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 47, fig. 20): C32-hopanol TMSi éther (17-βH-21β H) (M = 528).

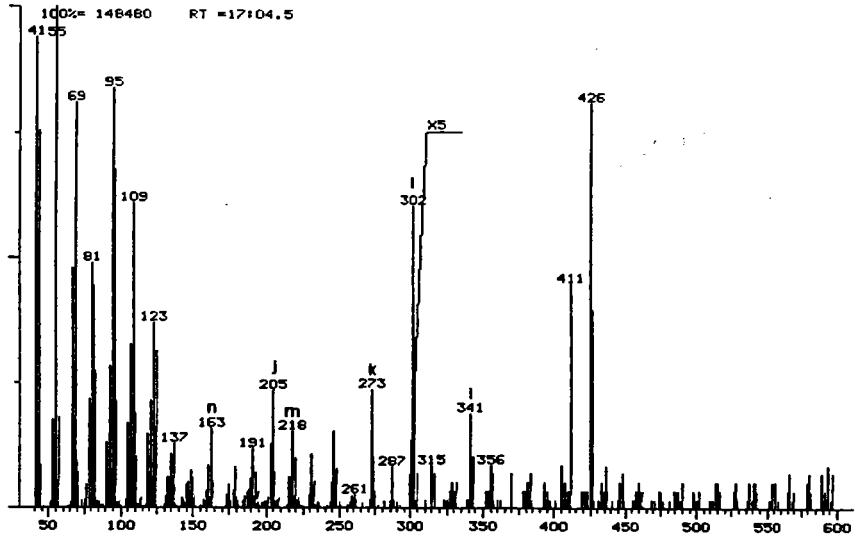


Fig. 95: Spectre de masse du triterpénoïde F7 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 26, fig. 19): friedeline (M = 426).

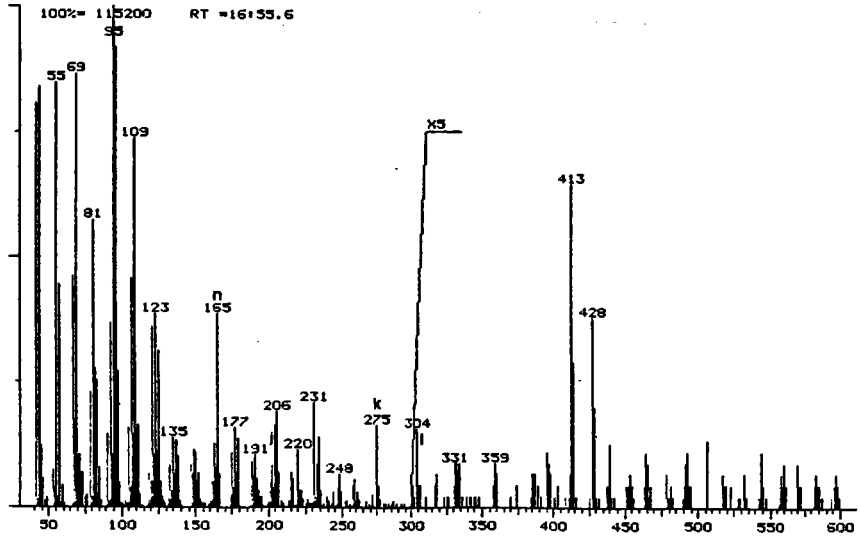


Fig. 96: Spectre de masse du triterpénoïde F6 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 25, fig. 19): épi-friedelanol (M = 428).

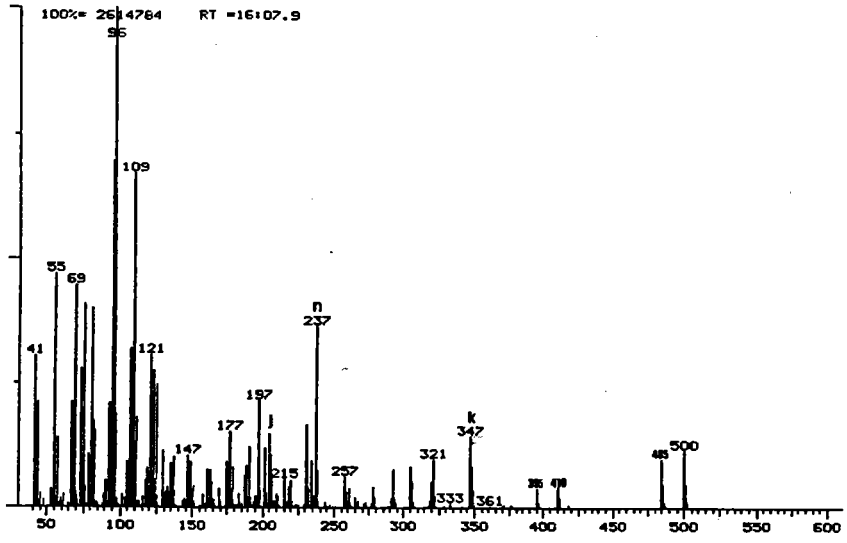


Fig. 97: Spectre de masse du triterpénoïde F15 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 36, fig. 20): épi-friedelanol TMSi éther (M = 500).

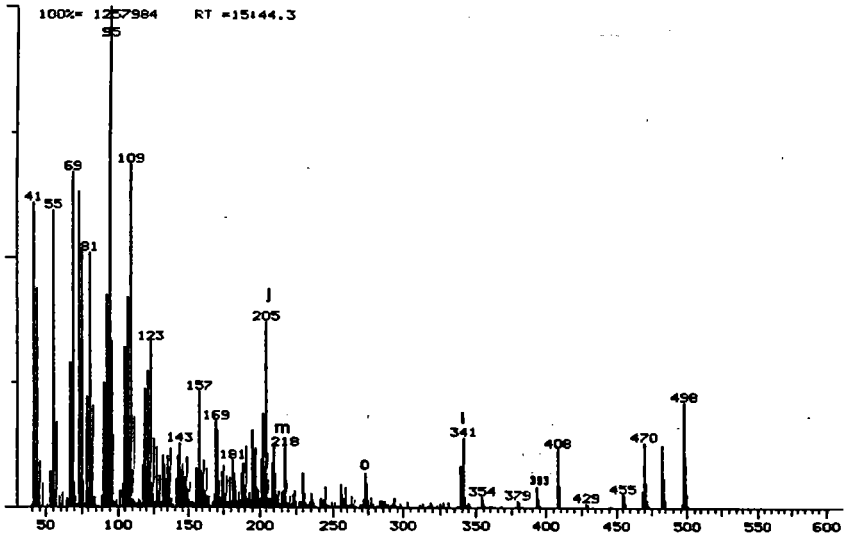


Fig. 98: Spectre de masse du triterpénoïde F13 $C_{30}H_{50}O$ (TMSi éther) obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 34, fig. 20) (M = 498).

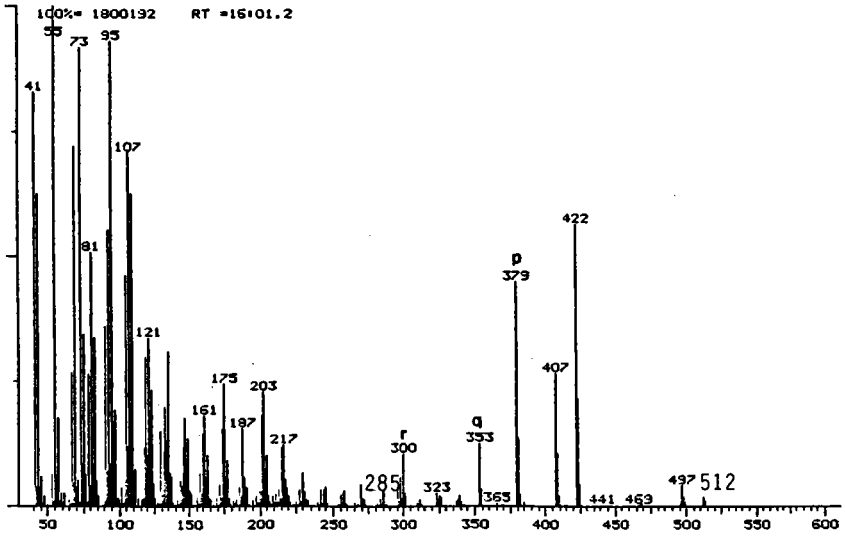


Fig. 99: Spectre de masse du triterpénoïde F16 obtenu à partir de la fraction insaponifiable Fi par couplage CPV-SM (pic 37, fig. 20): cyclolaudénol TMSi éther (M = 512).

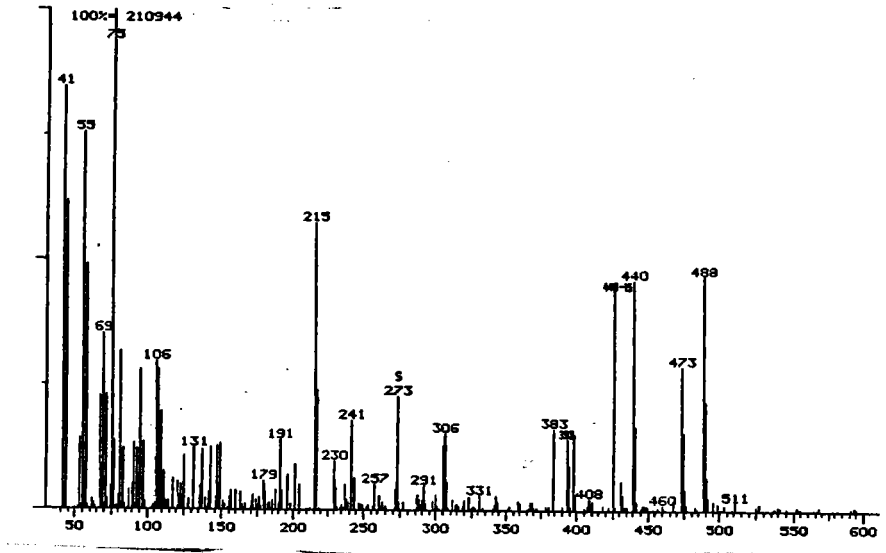


Fig. 100: Spectre de masse du triterpénoïde V1 + β-stigmastanol obtenu à partir de la fraction insaponifiable VOi par couplage CPV-SM (pics 21-22, fig. 28): fernénol méthyl-éther (M = 440).

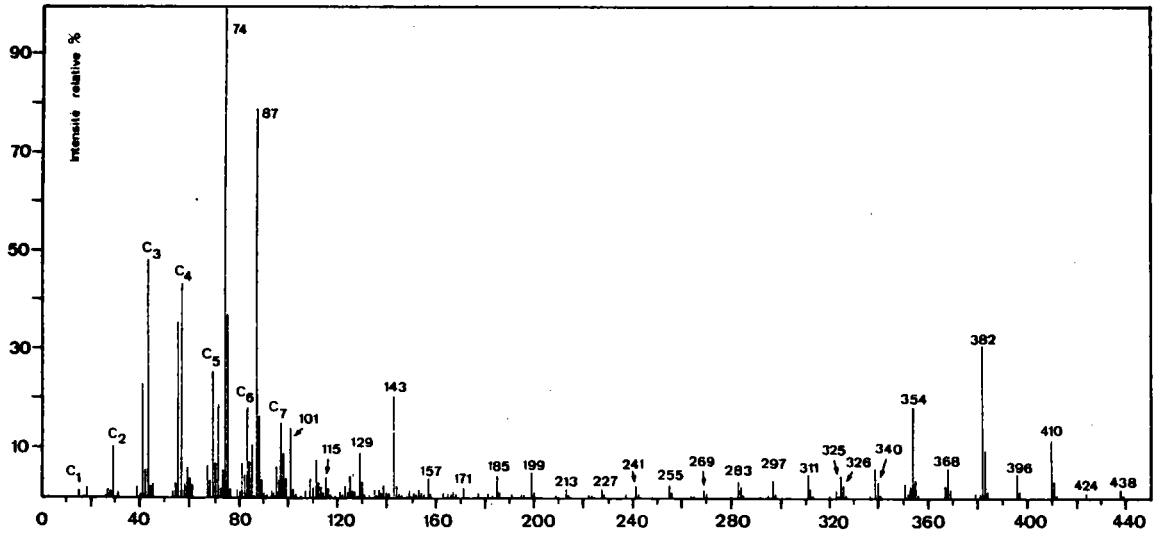


Fig. 101: Spectre de masse de la fraction acide Fa méthylée obtenu par introduction directe (90 °C).

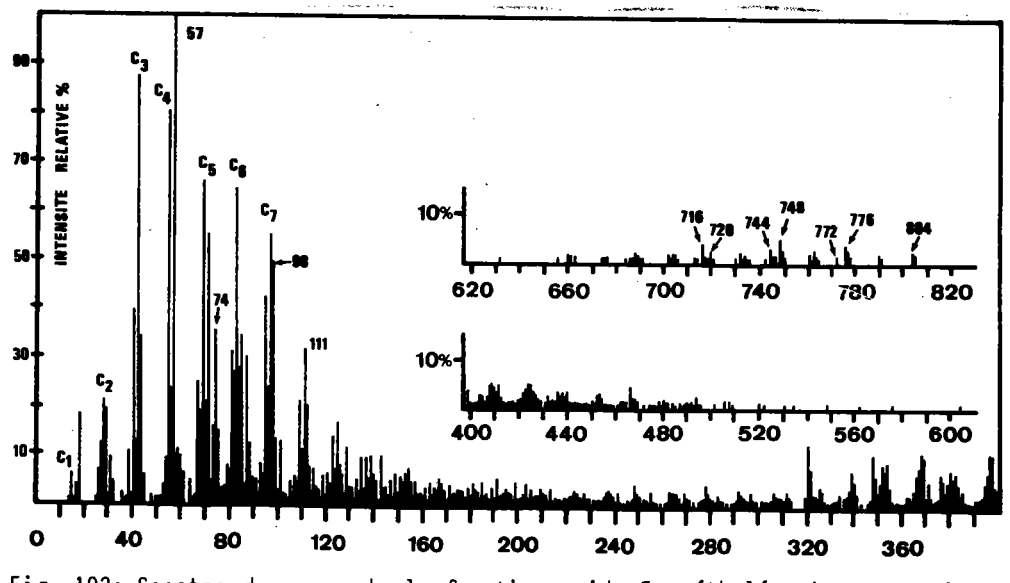


Fig. 102: Spectre de masse de la fraction acide Fa méthylée obtenu par introduction directe (220 °C).

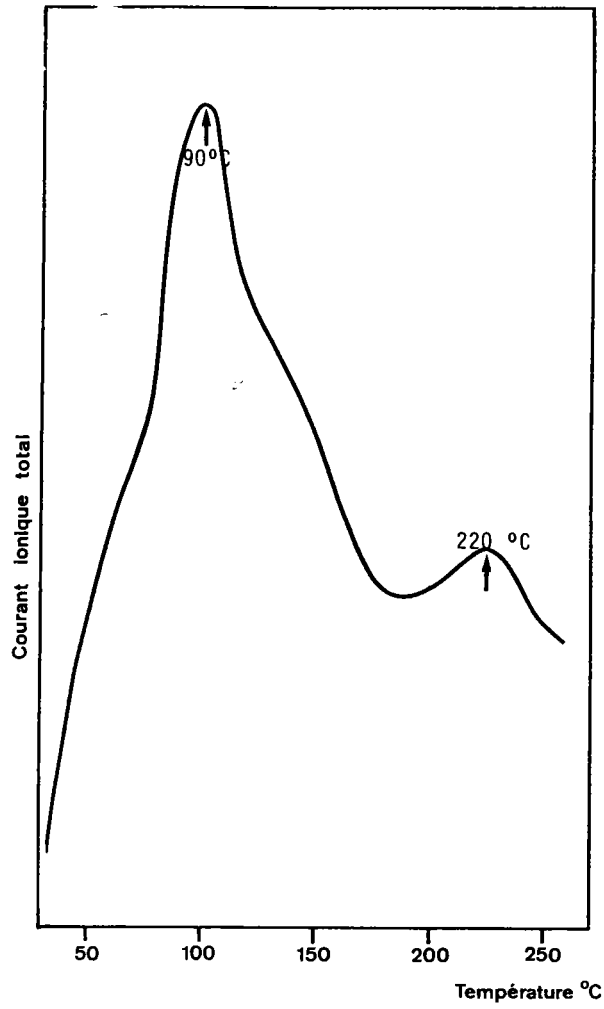


Fig. 103: Spectrométrie de masse de la fraction acide Fa méthylée par introduction directe: courant ionique total collecté en fonction de la température du dispositif d'introduction.

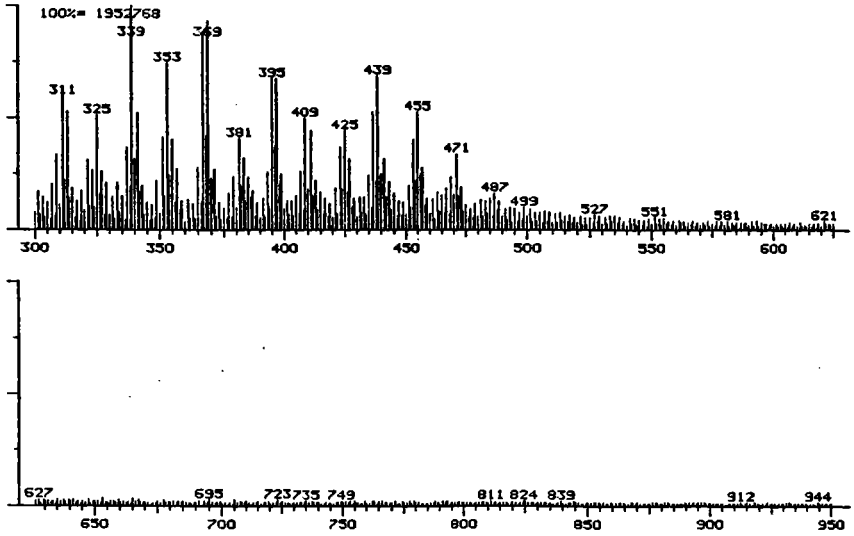


Fig. 104: Spectre de masse de la fraction acide Fa par introduction directe, ionisation chimique (gaz réactant: méthane).

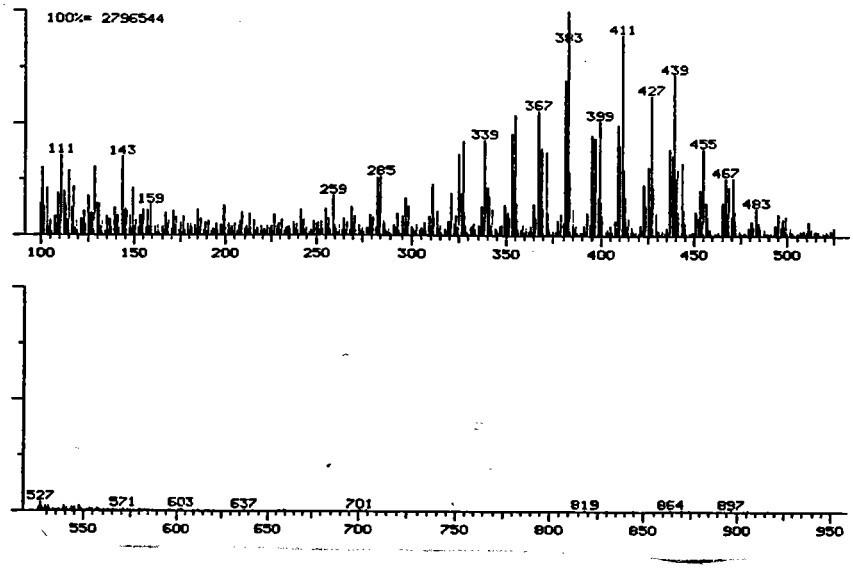


Fig. 105: Spectre de masse de la fraction acide V1a méthylée par introduction directe, ionisation chimique (gaz réactant: méthane).

CONCLUSIONS GENERALES

ET DISCUSSION DES RESULTATS

DISCUSSION DES RESULTATS ET CONCLUSIONS GENERALES

A la suite de nombreux travaux sur les cires de tourbes d'origines très diverses, qui ont permis de mettre en évidence des acides gras , des alcools gras, des stérols et quelques triterpénoïdes, nous nous sommes intéressés à notre tour aux cires extraites à l'éther éthylique d'une tourbe commerciale ("Floratorf"), d'une tourbe locale (forêt de Vitrimont, Meurthe-et-Moselle) prélevée à deux profondeurs (0-10 cm et 80 cm) et d'un anmoor (étang de Lachaussée, Meuse), également prélevé à deux profondeurs (0-10 cm et 10-20 cm).

Les méthodes classiques de caractérisation 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. Les cires brutes sont constituées d'esters, d'acides et d'alcools libres. Après saponification, les diverses cires sont séparées en fraction acide et fraction insaponifiable. La figure 106 ci-après représente les bilans de ce fractionnement pour les divers échantillons.

Les compositions centésimales des fractions acides ou insaponifiables montrent qu'il s'agit de composés relativement plus riches en oxygène et moins en hydrogène qu'un acide gras ou un alcool gras normal. Les masses molaires moyennes en nombre des diverses fractions sont de l'ordre de 500 ou supérieures à 500.

La mesure de l'indice d'iode semble de plus indiquer la présence de doubles liaisons éthyléniques.

L'étude spectroscopique (IR, RMN ^{1}H et ^{13}C) montre qu'il s'agit principalement de substances à longue chaîne, peu ramifiées, possédant une fonction acide carboxylique et des groupements hydroxyles. La fraction insaponifiable présente également une structure mono ou polyhydroxylée.

Les méthodes spectroscopiques ne permettent pas de confirmer la présence de doubles liaisons ni de mettre en évidence de structures aromatiques.

L'analyse par chromatographie en phase vapeur des dérivés méthylés des fractions acides des divers échantillons nous a permis d'identifier des acides gras ayant 16 à 34 atomes de carbone. Par couplage CPV-spectrométrie de masse, nous avons montré que ces acides sont essentiellement des acides gras saturés linéaires. Les acides insaturés ou ramifiés ou encore comportant un autre groupe fonctionnel (carbonyle, époxy, etc) sont présents en très faibles proportions ou absents (exception faite des hydroxy-acides). Par contre, nous avons pu détecter par CPV et spectrométrie de masse de faibles quantités d'α-ω diacides normaux en C22, C24, C26 et C28 dans les diverses fractions acides.

L'analyse quantitative par CPV montre que les acides gras identifiés constituent suivant les échantillons de 10% à 27% de l'échantillon injecté, soit de 9 à 17% de la cire brute (sauf pour l'échantillon de surface de l'anmoor de Lachaussée qui contient peu d'acides). Les acides à nombre pair d'atomes de carbone sont prédominants, en particulier les acides tétracosanoïque (C24) et hexacosanoïque (C26): cette répartition des acides gras en fonction de la longueur de chaîne rejoint les résultats obtenus par d'autres auteurs à partir de tourbes d'origines très diverses (3, 21, 23, 25, 26, 33, 34). Notons que ces acides en C24 et C26 sont rarement rencontrés dans les huiles et les graisses, dans lesquelles les acides en C16 et C18 sont les plus abondants.

La présence d'hydroxy-acides responsables de réactions de polycondensation dans les cires de tourbes a été suggérée par RAUHALA (22), mais leur mise en évidence n'avait pu être menée à bien (21).

Par couplage CPV-spectrométrie de masse, après méthylation des fonctions carboxyles et silylation des fonctions hydroxyles, nous avons, pour la première fois dans une cire de tourbe, identifié des ω-hydroxy-acides à chaîne linéaire de C16 à C28, essentiellement à nombre pair d'atomes de carbone, surtout les termes en C22, C24 et C26 (44). Nous avons par ailleurs caractérisé ces hydroxy-acides par les spectres de

masse des α-ω diols (bis-TMSi éthers) de C16 à C28 correspondants obtenus par réduction des fonctions COOH. Seuls les spectres des α-ω diols en C10 et C22 avaient été décrits dans la littérature (89). Nos spectres ont d'ailleurs servi de références à EKMAN R. et coll. pour établir la présence d'hydroxy-acides dans des tourbes de Finlande (45).

Nous avons retrouvé ces mêmes hydroxy-acides dans les deux échantillons de la tourbe de Vitrimont et les deux échantillons de l'anmoor de Lachaussée. Leur proportion globale dans les diverses cires varie de 1 à 11%.

Par préfractionnement par chromatographie sur colonne d'alumine on peut séparer les hydroxy-acides et les acides gras des autres substances, notamment des substances non volatiles en CPV qui représentent une fraction importante de l'échantillon injecté (42% à 67% suivant les échantillons).

Ce préfractionnement nous permet également de séparer les substances insaponifiables des cires en plusieurs fractions, dans lesquelles nous avons identifié par CPV et spectrométrie de masse les composés suivants:

- fraction I: n-alcanes de C21 à C35 et divers triterpénoïdes (hydrocarbures et cétones);
- fraction II: alcools gras de C16 à C34 et alcools triterpéniques;
- fraction III: stérols (campestérol, campestanol, stigmastérol et surtout β-sitostérol et β-stigmastanol).

Les alcools gras, essentiellement à nombre pair d'atomes de carbone comme les acides gras, représentent avec les stérols les deux classes de composés neutres les plus importantes (respectivement 4-12% et 2-4% des cires brutes). Leur présence dans les tourbes semble d'ailleurs être universelle (23, 25, 30, 34, 48, 50, 53, 56).

Les n-alcanes, pour lesquels les termes à nombre impair d'atomes de carbone sont prépondérants, sont présents en plus faibles proportions (0,4-1,4%).

Parmi les triterpénoïdes que nous avons identifiés dans la tourbe "Floratorf", citons:

- la friedeline et l'épi-friedelanol déjà signalés dans une tourbe d'Ecosse (51) et dans une tourbe d'Israël (52);

- l'α-amyrine, le taraxérol et la taraxérone trouvés dans une tourbe canadienne (50);
- la β-amyrine, le moréténol et le cyclolaudénol.
- les hopanoïdes (acides et alcools en C32, hydrocarbure en C31).

Parmi les triterpénoïdes de la tourbe de Vitrimont, nous avons essentiellement identifié la friedeline. La présence d'autres triterpénoïdes n'est pas exclue, mais ils sont présents en proportions plus faibles que dans la tourbe "Floratorf".

L'anmoor de Lachaussée ne semble pas en contenir ou peut-être seulement à l'état de traces.

Les diverses fractions insaponifiables renferment, comme les fractions acides, des substances non volatiles en CPV (43 à 60% de l'échantillon injecté).

Dans l'espoir de réduire la longueur de chaîne des composés non volatils de la fraction acide des cires de la tourbe "Floratorf", par coupure au niveau d'éventuelles doubles liaisons, nous avons soumis cette cire à diverses réactions de dégradation: ozonolyse, hydroxylation par l'acide peracétique et coupure du diol formé par HIO_4, dégradation oxydative par HIO_4 en présence de $KMnO_4$ ou action de RuO_4. On observe alors une 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 réactions secondaires n'entraînant qu'une coupure partielle des doubles liaisons, ou encore de rendements de réaction trop faibles.

Par ailleurs ces composés ne semblent pas contenir de fonctions éthers, puisque les réactions de coupure par l'iodotriméthylsilane n'ont donné aucun résultat nouveau.

Afin de réduire la polarité de ces composés et de déterminer leur squelette carboné, nous avons entrepris d'effectuer l'hydrogénolyse des diverses fonctions oxygénées.

D'une part l'action de $LiAlH_4$ ou de $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$ permet de réduire en fonctions alcools les fonctions acides et

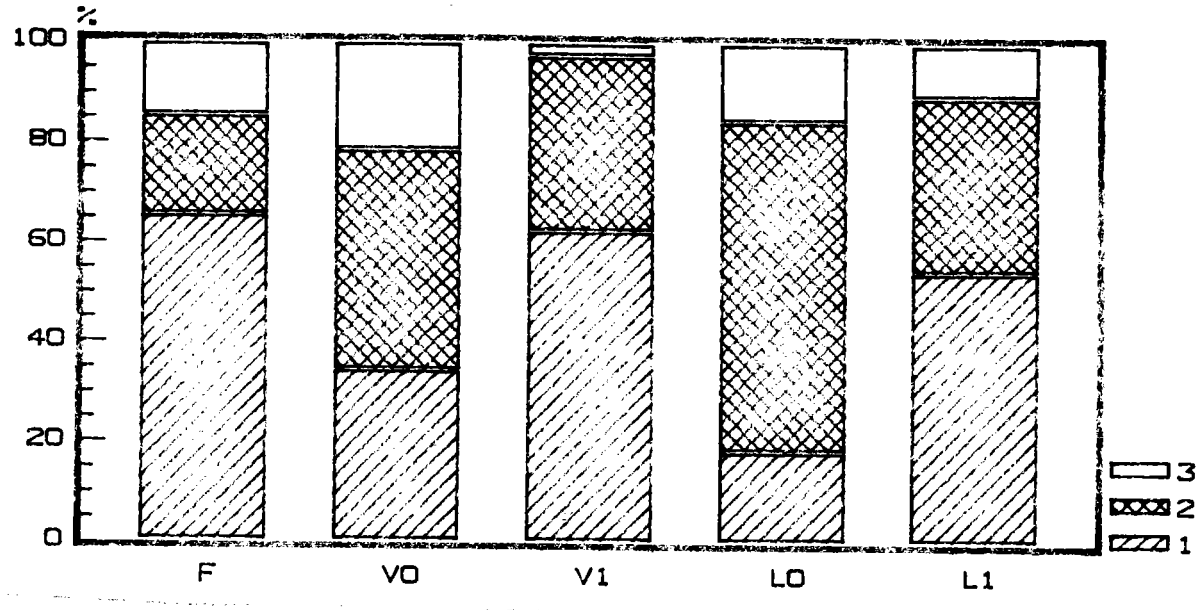
éventuellement cétones, époxydes et peroxydes, ainsi que les esters résiduels résultant d'une saponification incomplète ou d'une recondensation des hydroxy-acides. De cette manière, après silylation des alcools obtenus après réduction, nous avons retrouvé les alcools gras de C16 à C34 correspondant aux acides gras précédemment identifiés, ainsi que les α-ω diols correspondant aux hydroxy-acides. Les résultats quantitatifs de la cire ainsi réduite sont en accord avec ceux de la fraction acide non réduite, ce qui montre que les substances de masses molaires élévées ne sont pas des polyesters.

D'autre part, l'action de HI en tube scellé à 220 °C, permet, en principe, de réaliser l'hydrogénation totale des substances en une seule étape (méthode 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 C16 à C34 à partir de la cire brute ou de la fraction acide, est de l'ordre de 40%, ce qui correspond à la proportion des substances volatiles déterminées par CPV (acides gras et hydroxy-acides).

En définitive les méthodes chimiques nous montrent que les substances non volatiles en CPV ne sont ni des polyesters ni des polyéthers. Les résultats de la RMN ^{1}H et ^{13}C permettent d'exclure les structures aromatiques.

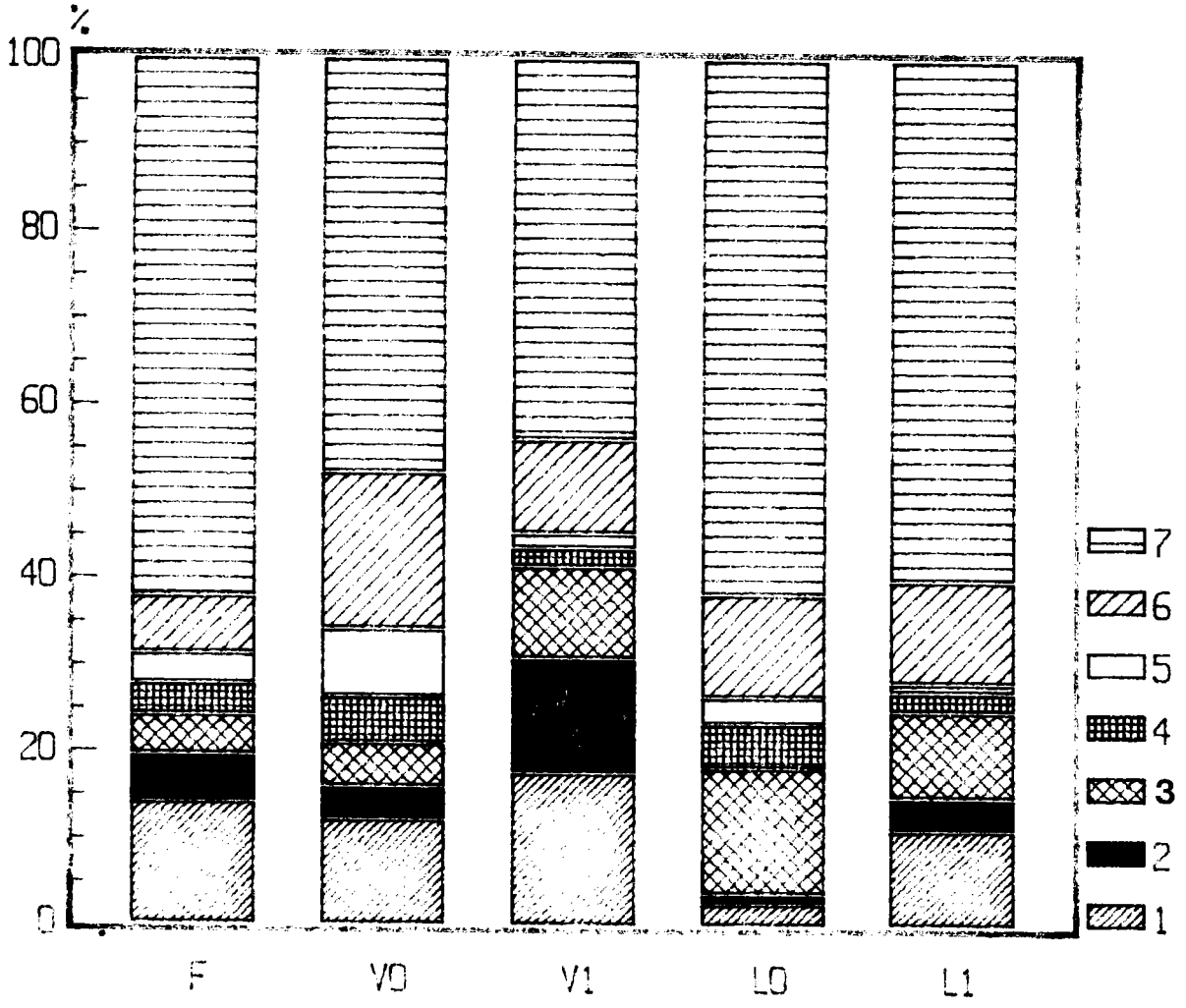
L'étude des cires de la tourbe "Floratorf" par CLHP (chromatographie d'adsorption sur silice, chromatographie de partage en phase inverse) ne nous a pas apporté de résultats supplémentaires. Par contre, la chromatographie par perméation de gel nous a permis de séparer, à partir des fractions acides et insaponifiables, des substances de masses molaires 250-500 (16 à 34 atomes de carbone) et des substances de taille approximativement double de masses molaires 800-1100. Ces dernières, non volatiles en CPV, n'ont pu être caractérisées par spectrométrie de masse par introduction directe, ni par ionisation électronique ni par ionisation chimique.

Nous pensons qu'il s'agit de stuctures aliphatiques peu ramifiées de l'ordre de C50-C70 ou de chaînes en C30-C40 liées à des stuctures polycliques saturées, comme par exemple les stéroïdes et les triterpénoïdes.



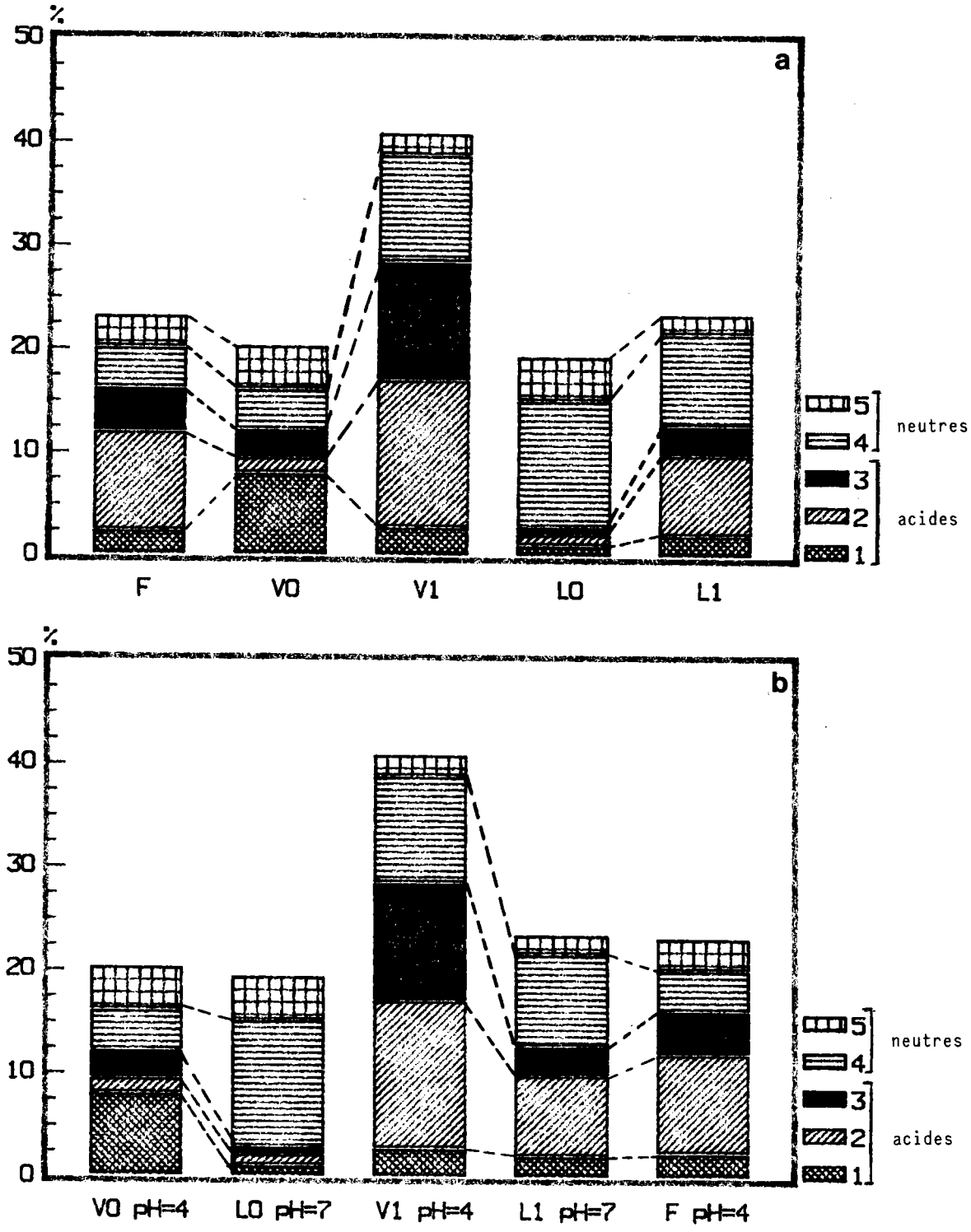
1 - acides 2 - insaponifiable 3 - pertes

Fig 106: Bilan pondéral de la saponification des différentes cires.



1 - acides gras 2 - hydroxy-acides 3 - alcools gras
4 - stérols 5 - alcanes et autres substances 6 - volatils non identifiés
7 - non volatils

Fig. 107: Bilans pondéraux des analyses par CPV des différentes cires (en % de la cire brute).



1 - acides gras C14-C20 2 - acides gras > C20 3 - hydroxy-acides

4 - alcools gras 5 - stérols

Fig. 108: Histogrammes cumulés des principales substances identifiées dans les divers échantillons (en % de la cire brute).
a) influence de la profondeur; b) influence du pH du sol.

DISCUSSION DES RESULTATS.

Les histogrammes de la figure 107 (bilan pondéral des analyses par CPV) résument les résultats quantitatifs obtenus à partir des différents échantillons de tourbes ou d'anmoor.

La figure 108, établie d'après les résultats du tableau XX (page 80), permet de comparer les proportions des principales classes de substances identifiées en fonction de la profondeur et en fonction du pH du sol et de dégager les points suivants.

- Les acides gras à chaîne relativement courte (C14-C20), sont plus abondants que les acides à chaîne longue (>C20) dans l'échantillon de surface de la tourbe de Vitrimont, surtout l'acide eicosanoïque (C20), Cette situation s'inverse pour l'échantillon prélevé à 80 cm de profondeur. Ces acides gras à chaîne courte (C14-C20) prédominent dans les végétaux des tourbières, alors que les acides à chaîne > C20 prédominent dans les tourbes (33). Cette propriété pourrait peut-être constituer un des éléments servant à définir le degré de décomposition d'une tourbe.

Cette situation se retrouve également dans l'anmoor, où les deux classes d'acides gras sont en proportions faibles, mais à peu près égales, dans l'échantillon de surface (0-10 cm), alors que les acides > C20 prédominent dans l'échantillon L1 (10-20 cm).

Les acides à chaîne courte (<C20) sont moins résistants aux divers processus de dégradation que les acides à chaîne plus longue, comme l'ont montré MOUCAWI et coll. (106). En effet, ces auteurs ont étudié la dégradation de l'acide stéarique et de l'acide montanique (C28) incorporés dans divers sols de pH différents. La biodégradation de l'acide stéarique est plus rapide dans les sols acides, alors que celle de l'acide montanique (et d'autres composés de même longueur de chaîne) est faible dans tous les sols étudiés.

- L'augmentation des acides gras à chaîne > C20 avec la profondeur, aussi bien pour l'anmoor que pour la tourbe, provient sans doute de la libération de ces acides par dégradation des cires cuticulaires, ce qui nécessite un certain degré de maturation des dépôts végétaux.

- On peut faire les mêmes conclusions en ce qui

concerne les hydroxy-acides dont les proportions augmentent également avec la profondeur pour les deux sols étudiés. Ils sont libérés par hydrolyse des polyesters de la cutine ou de la subérine, par l'action de microorganismes (bactéries ou champignons).

- La proportion d'alcools gras augmente également avec la profondeur. Nous pensons qu'ils proviennent à la fois de la libération à partir des tissus végétaux et de la réduction bactérienne d'acides gras en milieu anaérobie.

- En milieu neutre, la production d'alcools gras est favorisée et l'échantillon de surface de l'anmoor contient peu d'acides. Contrairement à la tourbe leur proportion diminue avec la profondeur, peut-être à cause de la dégradation plus rapide en milieu neutre (cf fig. 108b). Les acides gras et les hydroxy-acides sont libérés en profondeur et leurs proportions deviennent comparables à celles des tourbes.

- Les variations entre les différentes classes de substances, indiquées en pointillés sur la figure 108a, montrent que la tourbe "Floratorf" est tout à fait analogue à la tourbe de Vitrimont prélevée à 80 cm de profondeur. Les chromatogrammmes correspondants (fig. 14 et 25 par exemple) montrent que cette similitude se retrouve même dans la répartition des différents termes en fonction de la longueur de chaîne.

- La proportion de stérols diminue légèrement dans les deux cas.

- Nous portons une attention toute particulière aux hopanoïdes que nous avons trouvés dans la tourbe "Floratorf" (non figurés sur les histogrammes): l'hydrocarbure en C31 (17αH-21βH) et les acides et alcools en C32.

L'épimère 17βH-21βH des hopanoïdes en C32, d'origine bactérienne, est prédominant dans la tourbe "Floratorf". On retrouve cette situation en général dans les bactéries (procaryotes), où les hopanoïdes sont des constituants essentiels des membranes cellulaires et jouent un rôle analogue à celui des stérols dans les membranes d'eucaryotes (107). Au contraire, dans les sédiments anciens, les épimères αβ des hopanoïdes >C30, thermodynamiquement plus stables, prédominent. De plus, dans les sédiments anciens, on trouve un mélange en

proportions approximativement égales des deux diastéréoisomères en position 22 (voir formule VIII-3 page 133), ce qui se traduit par la présence d'un doublet dans les chromatogrammes (108). Dans les sédiments récents les divers hopanoïdes > C30 présentent la configuration 22R, ce qui a été montré par RMN ^{1}H (58). Ces changements dans la structure stéréochimique ont été proposés comme test pour la détection d'une pollution de sédiments récents par du pétrole brut (108) et font actuellement l'objet d'études pour la détermination du rang de charbons (109).

L'hydrocarbure en C31 (17αH-21βH) que nous avons trouvé est probablement associé à la dégradation microbienne de la matière végétale et apparait dès les premiers stades de la dégradation des mousses de tourbières (59).

La prépondérance des épimères ββ des hopanoïdes en C32, la présence d'une quantité notable du C31-hopane (αβ), ces composés se présentant sous forme d'un seul diastéréoisomère en position 22 (absence de doublets dans nos chromatogrammes), sont caractéristiques d'un sédiment récent ou immature.

Ce travail confirme donc la présence universelle des acides gras et des alcools gras à longue chaîne, ainsi que celle des stérols, dans les matières végétales en décomposition et a permis d'établir celle des ω-hydroxy-acides dans les tourbes et un autre type de sol. La présence de divers triterpénoïdes, à l'exception des hopanoïdes associés à la dégradation bactérienne des plantes et dont la stéréochimie est en relation avec la maturation des sédiments, semble davantage liée aux sites géographiques et à la nature de la végétation.

ANNEXES

ANNEXE I: 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 $NaHCO_3$ et titre par $Na_2S_2O_3$ N/10. On effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions.

Essai à blanc: n ml de $Na_2S_2O_3$ N/10

Essai avec m mg de substance: N ml de $Na_2S_2O_3$ N/10

Indice d'iode = (N-n) x 1,27 / m

ANNEXE II: 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.

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 un 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:

$$(n-n') \times 0,05 / 6m$$

n: nombre de ml de thiosulfate 0,05N versés pour l'essai.
n': nombre de ml de thiosulfate de sodium versés pour l'essai à blanc effectué dans les mêmes conditions.
m: masse de la prise d'essai en g.

ANNEXE III: Méthylation des fractions acides des cires.

10 à 100 mg de fraction acide dissoute dans 30 ml d'un mélange benzène-méthanol-acide sulfurique concentré

(10-10-0,5), sont chauffés sous reflux pendant une heure. Après refroidissement, le mélange est lavé à l'eau distillée jusqu'à neutralité des eaux de lavage et séché sur sulfate de sodium anhydre.

ANNEXE IV: Indice d'hydroxyle.

Réactif: 1 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 mg de cire. L'indice d'hydroxyle en méquiv. OH par g de cire est donné par:

$$a + (n - n') / m$$

où a est l'acidité de 1 g de cire.

ANNEXE V: 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:

$$(n-n') / 20m$$

ANNEXE VI: Préparation des 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 $BaCl_2,2H_2O$ à 1% dans le méthanol et 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 °C.

ANNEXE VII: Réduction de la fraction acide des cires.

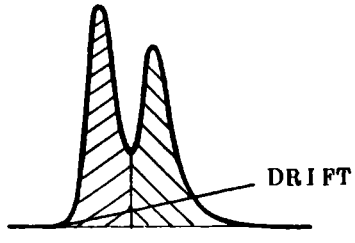
Environ 100 mg de produit à réduire sont dissous dans 20 ml de benzène. On ajoute 10 ml d'une solution de $NaAlH_2(OC_2H_4OCH_3)_2$ à 70% dans le benzène. Le mélange est agité pendant 1 heure, puis chauffé pendant 3 heures à l'abri de l'humidité de l'air. Les complexes d'aluminium sont alors détruits par agitation avec de l'acide chlorhydrique à 20% refroidi par de la glace pendant 30 minutes. Les alcools obtenus sont extraits au benzène.

ANNEXE VIII: Silylation.

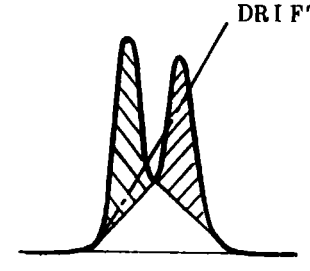
L'échantillon, le solvant et quelques gouttes d'agent silylant (BSA ou N-TSIM) sont introduits dans une petite fiole munie d'un bouchon à vis en bakélite, qui en assure la fermeture par l'intermédiaire d'un disque en silicone dont la face inférieure est recouverte de téflon. L'ensemble est porté à 80 °C pendant 15 à 30 minutes. La silylation est en général complète dès que la dissolution de l'échantillon est achevée. L'échantillon est prêt pour l'injection dans le chromatographe.

ANNEXE IX: Paramètres d'intégration des chromatogrammmes.

- WIDTH: 4s: largeur à mi-hauteur des pics les plus étroits.
- SLOPE: 100 (µV/min): sensibilité pour la détection des pics.
- TDBL: 0: après un temps prédéterminé les paramètres SLOPE et WIDTH sont doublés (0 = automatique).
- LOCK: 5: les pics dont les temps de rétention sont inférieurs à 5 minutes ne sont pas intégrés.
- DRIFT: 0 (automatique) entre 0 et 23 minutes, 120 après 23 minutes: permet de compenser les dérives de la ligne de base et de modifier l'intégration des pics non résolus (schémas a et b ci-dessous).
- MIN AREA: 500: permet d'éliminer les petits pics dont l'aire est inférieure à 500 coups.



a) DRIFT 0



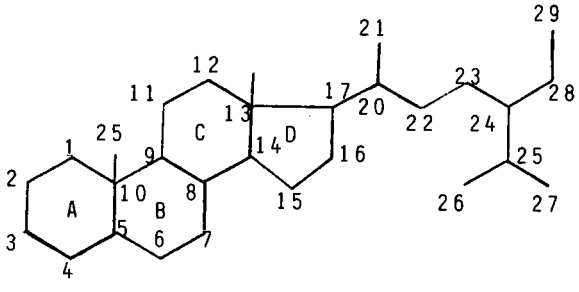
b) DRIFT 120

ANNEXE X: Nomenclature des triterpénoïdes cités.

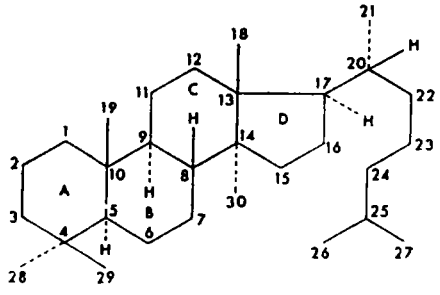
Nom usuel	Nomenclature officielle
taraxérène	D-friedo-oléana-14-ène
taraxérol	3ß-hydroxy D-friedo-oléana-14-ène
taraxérone	3-oxo D-friedo-oléana-14-ène
α-amyrine	3ß-hydroxy ursa-12-ène
ß-amyrine	3ß-hydroxy oléana-12-ène
uvaol	3ß,28-dihydroxy ursa-12-ène
érythrodiol	3ß,28-dihydroxy oléana-12-ène
taraxastérol	3ß-hydroxy (18α, 19ßH)-ursa-20 (30)-ène
pseudo-taraxastérol	3ß-hydroxy (18α, 19ßH)-ursa-20-ène
lupéol	3ß-hydroxy lupa-20 (30)-ène
lupénone	3-oxo lupa-20 (30)-ène
bétuline	3ß,28-dihydroxy lupa-20 (30)-ène

hopène B	hop-22 (29)-ène
moréténol	3ß-hydroxy hop-22 (29)-ène
friedeline	3-oxo D:A-friedo-oléanane
épi-friedelanol	3ß-hydroxy D:A friedo-oléanane
cycloarténol	3ß-hydroxy 9:19-cyclo-(9ß)-lanosta-24-ène
cyclolaudénol	3ß-hydroxy 24b-méthyl -9:19-cyclo-(9ß)-lanosta-25-ène
24-méthylène-cycloarténol	3ß-hydroxy 24-méthylène-9:19-cyclo-(9ß)-lanostane
fernénol-méthyl-éther	3ß-méthoxy D:C-friedo B':A' néogammacer-9 (11)-ène

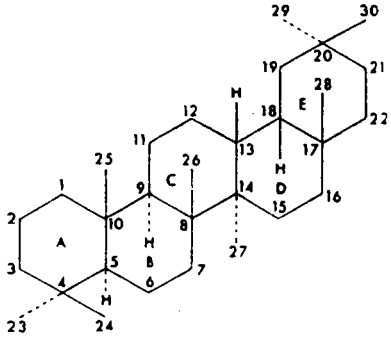
Squelettes carbonés des stéroïdes et des triterpénoïdes.



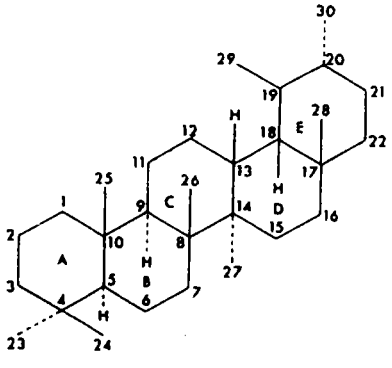
Stigmastane



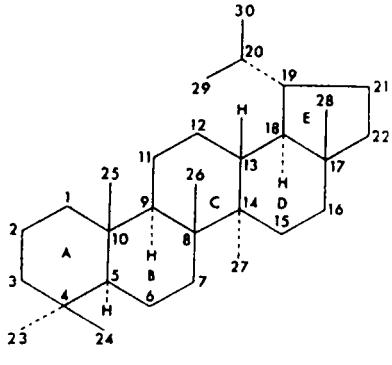
Lanostane



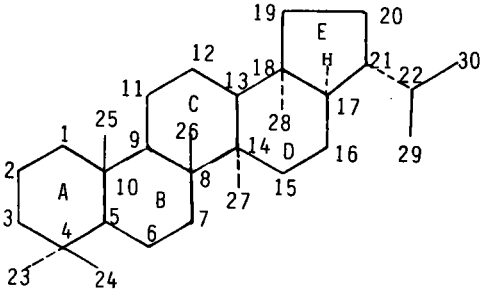
Oléanane



Ursane



Lupane



Hopane

ANNEXE XI: Dérivés pour la CLHP.

Dérivés des fonctions acides.

Le réactif est une solution de p-dibromo-acétophénone (2 millimoles) et de dicyclohexyl-18-couronne-6-éther (0,2 millimole) dans 80 ml d'acétonitrile. On dissout quelques dizaines de mg de cire (fraction acide) dans 8 ml de réactif. On chauffe sous reflux en agitant vigoureusement pendant 45 minutes en présence de carbonate de potassium anhydre (380 mg). Après refroidissement, la solution filtrée est prête à l'injection.

Dérivés des fonctions alcools.

On dissout 10-20 mg de fraction insaponifiable dans 5 ml de THF et on fait réagir dans un réacteur scellé avec 500 mg de chlorure de dinitro 3,5 benzoyle pendant 1 heure à 60 °C en agitant. L'échantillon est prêt à l'injection.

BIBLIOGRAPHIE

(1) FUCHSMAN C.H. "Peat industrial Chemistry and Technology", Academic Press, New York, 1980.

(2) EGLINTON et MURPHY M.T.J. ed "Organic Geochemistry". Springer-Verlag Berlin 1969.

(3) IKAN R. et coll. Israël J. of Chem. 1968, 6, p. 485-489.

(4) BREGER I.A. "Organic Geochemistry". Pergamon Press. Oxford 1963.

(5) RYAN H. et DILLON T. Sci. Proc. Dub. Roy. Soc. 1909, 12, p. 202-209.

(6) TITOW N. Brennstoff Chemie, 1932, 13, p. 266-269.

(7) RAKOWSKI E.W. et EDELSTEIN N.G. Brennstoff chemie, 1932, 13, p. 46-49.

(8) ROGINSKAYA E.V. J. of Appl. Chem. (URSS), 1936, 9, p. 108-111.

(9) REILLY J. et WILSON J.P. Sci. Proc. Dub. Roy. Soc. 1940, 22, n° 34, p. 108-111.

(10) REILLY J., KILBRIDE D.A. et WILSON J.P. Biochem. J. 1943, 37, p. 195-197.

(11) CARLISLE C.H. et CROWFOOT D. Biochem. J., 1943, 37, p. 197-198.

(12) VOLAROVICH M.P. et GUSEV K.F. Kolloid. Zh., 1956, 18, p. 643-646. Chem. Abstr. 51 6980a.

(13) KAGANOVICH F.L. et coll. Tr. Inst. Torfa, Akad. Nauk Belorusk. SSR, 1959, 7, p. 123-130. Chem. Abstr. 55, 8815 h.

(14) BEL'KEVICH P.I. et coll. Tr. Inst. Torfa, Akad. Nauk Belorusk. SSR, 1960, 9, p. 274-279. Chem. Abstr. 56, 2666 a.

(15) BEL'KEVICH P.I. et coll. Akad. Nauk Belarusk. SSR Inst. Torfa, 1962, p. 173-176. Chem. Abstr. 58, 8817.

(16) THOMAS J.D.R. J. Appl. Chem., 1962, 12, p. 289-294.

(17) KWIATOWSKI A. Zeszyty Nauk Polytech. Gdansk., Chem. 1963, 33, (5), p. 29-51. Chem. Abstr. 60, 5942 c.

(18) KWIATOWSKI A. Valtion Tek. Tutkimuslaitos Julkaisu, 1965, 93.

(19) SUNDGREN A. et RAUHALA V.T. Suomen Kem. 1949, B 22, p. 24-32.

(20) SUNDGREN A et RAUHALA V.T. J. Am. Oil Chem. Soc., 1952, 29, p. 611.

(21) SUNDGREN A. et RAUHALA V.T. Valtion Tek. Tutkimuslaitos Julkaisu, 1965, 92.

(22) RAUHALA V.T. J. Am. Oil Chem. Soc., 1961, 38, p. 233-235.

(23) MORRISSON R.I. et BICK W. J. Sci. Food Agr., 1967, 18, p. 351-355.

(24) MORRISSON R.I. et BICK W. Chem. and Ind., 1966, 14, p. 596-597.

(25) HEMMINGSON J.A. New Zealand J. of Science, 1972, 15,p. 449-452.

(26) IVANOVA L.A. et coll. Vestsi Akad. Navuk Belarus. SSR, Ser. Khim. Navuk, 1968, 4, p. 121-125. Chem. Abstr. 70, 79824 y.

(27) BEL'KEVICH P.I. et coll. Vestsi Akad. Navuk B. SSR, Ser. Khim. Navuk, 1971, n° 5, p. 111-114.

(28) BEL'KEVICH P.I. et coll. Vestsi Akad. Navuk B. SSR, Ser, Khim. Navuk 1977, n° 1, p. 49-52. Chem. Abstr. 87, 154678.

(29) ZHIL'TSOV N.I. et coll. Khim. Tverd Topl. (Moscow), 1982 (5), p. 117-119. Chem. Abstr. 98, 6276 q.

(30) TSERLYUKEVICH Ya.V. et coll. Khim. Tverd. Topl., 1975, n° 6, p. 60-62. Chem. Abstr. 84, 153008.

(31) BEL'KEVICH P.I. et coll. Vestsi Akad. Navuk B. SSR, Ser. Khim. Navuk, 1976, n° 5, p. 61-66. Chem. Abstr. 86, 174060.

(32) KOLOSKOVA Ya V. et coll. Khim. Tverd Topl. (Moscow), 1985, 5, p. 34-38. Chem. Abstr. 104, 53354.

(33) EKMAN E. Technical Research Centre of Finland Publications, 2/1981.

(34) EKMAN R. et KETOLA M., Kemia Kemi, 1981, 8, p. 7-8.

(35) EKMAN R. et FAGERNAS L. Finn. Chem. Lett., 1983, p. 129-133.

(36) FAGERNAS L. et coll., The Proceedings of the International Symposium of the IPS Commissions IV and II, 1982, Minsk (URSS), p. 18-31.

(37) VON RUDLOFF E. Can. J. Chem., 1959, 37, p. 1038-42.

(38) KOLATTUKUDY P.E.et WALTON T.J. Biochemistry, 1972, 11, p. 1897-1907.

(39) DOWNING D.T. et coll., Austr. J. Chem., 1961, 14, p. 619-27.

(40) TULLOCH A.P. J. Am. Oil. Chem. Soc., 50, 1973, p. 367.

(41) EGLINTON G. et coll., Tetrahedron, 1968, 24, p.5929-41.

(42) BOON J.J. et coll. "Advances in Organic Geochemistry", (R. Campos, J. Goni ed) 1975, p. 255-272.

(43) POPL M. et HAVEL Z. Fette, Seife, Anstrischmittel, 1975, 77, 2, p. 51-54.

(44) WILHELM J.C. et BLOCH J.M. Analusis, 1977, 5, (3), p. 135-43.

(45) EKMAN R. et KETOLA M. Finn. Chem. Lett, 1981, p. 44-47.

(46) EKMAN R. et KARUNEN P., Phytochemistry, 1982, 21, (1), p. 121-123.

(47) KARUNEN P. et EKMAN R. Physiol. Plant., 54, 1982, p.162-166.

(48) IVES D.A.J. et O'NEILL A.N., Can. J. Chem., 1958, 36, p. 434-349.

(49) IVES D.A.J. et O'NEILL A.N., Can. J. Chem., 1958, 36, p. 926-930.

(50) Mc LEAN J. et coll., Chem. and Ind., 1958, p. 1515-1516.

(51) BEL'KEVICH P.I. et coll. Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk, 1963, p. 112-115. Chem. Abstr. 58, 10011 d.

(52) IKAN R. et KASHMAN J., Israël J. of Chem., 1963, 1, p. 502-508.

(53) KAGANOVICH F.L. et coll. Khim. Tverd. Topl., 1974, n° 4, p. 67-69. Chem. Abstr. 82, 75383.

(54) BEL'KEVICH P.I. et coll. Khim. Tverd. Topl., 1977, n° 4 p. 551-53. Chem. Abstr. 87, 138443.

(55) BEL'KEVICH P.I. et coll. Khim. Tverd Topl. (Moscow), 1982, (3), p. 57-61. Chem. Abstr. 97, 95280.

(56) PIHLAJA K. et coll., Proc. Int. Peat. Symp., Bemidji, Minnesota (USA), 1981, p. 239-49.

(57) LUOMALA E. et KETOLA M., Proc. 7th Int. Peat. Congress, vol. 4, DUBLIN (Ireland), 1984, p. 307-16.

(58) TAYLOR J. et coll., Tetrahedron Letters, 1980, 21, p. 655-56.

(59) QUIRK M.M. et coll. Chemical Geology, 1984, 42, p. 25-43.

(60) WILHELM J.C. et BLOCH J.M. C.R. Acad. Sci., C, 1973, 276, p. 1481-84.

(61) WILHELM J.C., Thèse de 3ème Cycle, (Metz) 1974.

(62) WILHELM J.C. et BLOCH J.M. J. of Chromatography, 1980, 193, p. 329-332.

(63) PESEZ M. et POIRIER P. "Méthodes et réactions de l'analyse organique". Tome 1. MASSON, 1952.

(64) LUGOWSKA M. et MACHTINGER M. Bull. Soc. Chim. Fr., 1968, 12, p. 5084.

(65) Annales de Biologie Clinique, 1968, n° 7-9, p. 915.

(66) FLEURY P. "Fiches techniques de chimie biologique". Sang 3 ter, 1949.

(67) EASTMAN Organic Chemical Bulletin, 1974, 46.

(68) HUNNEMAN D.H. et coll. VARIAN Mat GmbH Application note n° 17.

(69) DURST H.D. et coll. Anal. Chem,. 1975, 47, p. 1797.

(70) LAWRENCE J.F. et FREI R.W. "Chemical Derivatization in Liquid Chromatography" Journal of Chromatography Library, vol. 7, Elsevier Scientific Publishing Company, 1976, p. 151.

(71) SEROUSSI G., Actual. Chim. S.C.F., 1974, 10, p. 23-25.

(72) SEROUSSI et T. VAN DE PUT "En chromatographie par perméation de gel: c'est la taille et non le poids qui fait la différence." Communication No 58, Waters Assoc., Paris, 1976, p. 1-5.

(73) 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.

(74) VON RUDLOFF E. Can. J. Chem., 1956, 34, p. 1413.

(75) SWERN D. "Epoxidation and hydroxylation of ethylenic compounds with organic peracids", Org. Reactions, 1953, 7, p. 378.

(76) WOLFE S. et coll. "Ruthenium Trichloride-catalysed hypochlorite Oxidation of Organic compounds", Chem. Comm., 1970, p. 1420-21.

(77) BERKOWITZ et RYLANDER P. "Use of Ruthenium tetroxide as a Multi-purpose Oxidant", J. Am. Chem. Soc. 80, 1958, 80, p. 6682-4.

(78) TSE-LOK H. et OLAH G.A. "Cleavage of esters and ethers with Iodotrimethylsilane", Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1976, 15, p. 774.

(79) M.E. JUNG et LYSTER M.A. J. Org. Chem., 1977, 42, p.3761.

(80) M.E. JUNG et ORNSTEIN P.L. Tetrahedron Lett., 1977, p. 2659.

(81) DOWNING D.T. et coll., Australian J. Chem., 1960, 13, p. 80-94.

(82) BERTHELOT M. "La synthèse chimique", Librairie GERMER BAILLIERE et Cie, Paris, 1883.

(83) 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.

(84) RYHAGE R. et STENHAGEN E., Arkiv. Kemi, 1959, 13, p. 523-542.

(85) RYHAGE R. et STENHAGEN E. Arkiv. Kemi, 1960, 15, p.291-315.

(86) RYHAGE R. et STENHAGEN E. Arkiv. Kemi, 1960, 15, p.333.

(87) RYHAGE R. et STENHAGEN E. Arkiv. Kemi, 1959, 14, p. 497.

(88) EGLINTON G., HUNNEMAN D.H. et Mc CORMICK A. Org. Mass Spectrometry, 1968, 1, p. 593-611.

(89) Mc CLOSKEY J.A., STILWELL R.N. et LAWSON A.M., Anal. Chem. 1968, 40, 233-236.

(90) O'NEAL M.J. Jr. et WIER T.P. Jr. Anal. Chem., 1951, 23, n° 6, p. 830-843.

(91) WALTON T.J. et KOLATTUKUDY P.E. Biochemistry, 1972, 11, p.1885-96.

(92) BROOKS C.J.W. et coll. Lipids, 1968, 3, p. 391-402.

(93) BROOKS C.J.W. et coll., Biochimica et Biophysica Acta 1973, 296, p. 431-445.

(94) WYLLIE S.G. et DJERASSI C., J. Org. Chem., 1968, 33, P. 305-13.

(95) NERMAG/SIDAR LIBRARY : BIBLIG EPA/NIH SPECTRA LIBRARY.

(96) BROOKS C.J.W. et EDMONDS C.G. "Combined Chromatography-Mass Spectrometry" dans "Practical Mass Spectrometry", B.S. MIDDLEDITCH ed, Plenum Press New York and London, 1979.

(97) KIMBLE B.J. et coll. Geochim. et Cosmochim Acta., 1974, 38, p. 1165-1181.

(98) BUDZIKIEWICZ J.M. et coll., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, P. 3688-99.

(99) MAUME B. et coll., C.R. Acad. Sci., Série D, 1972, 274, p. 133-136.

(100) HOOPER S.N. et coll., Lipids, 1982, 17, p. 60-63.

(101) PHILP R.P. "Fossil Fuel Biomarkers", 1985, Elsevier Amsterdam.

(102) CRAWFORD M. et coll., Tetrahedron Lett., 1975, n° 35, p. 3099-3102.

(103) HANSON S. W. et coll. Phytochemistry, 1976, 15, p. 1074-75.

(104) APLIN R.T. et HORNBY G.M. J. Chem. Soc. (B), 1966, p. 1078-79.

(105) OGUNKAYA L. Phytochemistry, 1981, 20, p. 121-126.

(106) MOUCAWI J., FUSTEC E., JAMBU P. Soil Biol. Biochem., 1981, 13, p. 461-68.

(107) OURISSON G. L'Actualité chimique, 1986, n° 5, p. 23-30.

(108 DASTILLUNG M. et ALBRECHT P. Mar. Pollut. Bull., 1976, 7, p. 13-15.

(109) ALBRECHT P., BLANC "GRECO Hydroconversion et Pyrolyse du Charbon, 1986.

TABLE DES MATIERES

page

INTRODUCTION

I- La tourbe, matière première 4

II- Terminologie 5

III- But de nos recherches 6

CHAPITRE I

HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CIRES DE TOURBE 8

I- Extraction 8

II- Composés à longue chaîne 8

III- Les hydroxy-acides 15

IV- Stérols et triterpénoïdes 16

CHAPITRE II

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE GLOBALE DES CIRES 22

I- Origine des échantillons. Nomenclature. 22

II- Extraction 23

III- Saponification 23

IV- Caractéristiques chimiques 24

IV-1 Composition 25

IV-2 Masse molaire 25

IV-3 Indice d'iode 27

IV-4 Indice de méthoxyle 27

IV-5 Acidité 27

IV-6 Fonctions hydroxyles et carbonyles 28

IV-7 Réactions qualitatives des stérols 29

IV-7-1 Réaction de Salkowski 29

IV-7-2 Réaction de Liebermann-Burchard 29

IV-7-3 Réaction de Zak 29

IV-8 Recherche de polyols 29

page

V- Etude spectroscopique 31
V-1 Spectre UV 31
V-2 Spectres IR 31
V-2-1 Cire brute Fb et fraction acide Fa 31
V-2-2 Cire Fa méthylée 32
V-2-3 Spectre IR des sels de baryum 33
V-2-4 Spectre IR de la fraction insaponifiable 33
V-3 Résonance magnétique nucléaire 33
V-3-1 RMN 1H 33
V-3-2 RMN 13C 36
VI- Conclusion 38

CHAPITRE III
ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE 39
I-Préfractionnement des cires 39
I-1 Intérêt d'un préfractionnement 39
I-2 Chromatographie d'adsorption 39
I-2-1 Chromatographie sur gel de silice 39
I-2-2 Chromatographie sur alumine 42
I-3 Réduction de la fraction acide des cires 44
I-4 Schéma de l'analyse chromatographique des cires 44
II- Chromatographie en phase vapeur 44
II-1 Choix de la colonne 44
II-1-1 Colonnes remplies 44
II-1-2 Colonnes capillaires 46
II-2 Techniques d'injection 46
II-3 Dérivés pour la CPV 47
II-3-1 Acides gras 47
II-3-2 Fonctions alcools 47
II-3-3 Hydrocarbures et cétones 48
II-4 Conditions expérimentales 49
II-4-1 Colonnes remplies 49
II-4-2 Colonnes capillaires 49
II-5 Analyse isotherme 50
II-5-1 Principe de l'identification des acides gras 50
II-5-2 Résultats de l'analyse isotherme de l'échantillon Fa . 51

page

II-6 Analyse à température programmée 52
II-6-1 Nécessité d'une programmation de température 52
II-6-2 Identification des différents composés 52
II-7 Analyse quantitative 53
II-7-1 Principe 53
II-7-2 Intégration des pics 55
II-7-3 Etalonnage 55
II-8 Résultats 57
II-8-1 Tourbe "Floratorf" 57
a) Fraction acide Fa 57
b) Fraction acide réduite Far 58
c) Fraction insaponifiable Fi 62
II-8-2 Tourbe de Vitrimont 66
a) Fractions acides VOa et V1a 66
b) Fractions insaponifiables VOi et V1i 69
II-8-3 Anmoor de Lachaussée..... 73
a) Fractions acides LOa et L1a 73
b) Fractions insaponifiables LOi et L1i 78
II-8-4 Comparaison des différents échantillons 79
III Chromatographie liquide haute pression (CLHP) 81
III-1 Matériel 81
III-2 Dérivés pour la CLHP 82
III-3 Chromatographie d'adsorption 83
III-4 Chromatographie de partage 86
III-5 Chromatographie par perméation de gel (CPG) 87
III-5-1 Etalonnage des colonnes 87
III-5-2 Résultats 89
IV- Conclusion 91

CHAPITRE IV
TENTATIVES DE DEGRADATION DES CIRES 93
I- Réactions de coupure de doubles liaisons 93
I-1 Ozonolyse 93
I-2 Action d'un periodate en présence de KMnO4 94
I-3 Hydroxylation par l'acide peracétique 94
I-4 Oxydation par NaOCl catalysée par RuCl3 95

page

II- Réactions de coupure de liaisons éthers 95
II-1 Utilisation du tétroxyde de ruthénium 95
II-2 Action de l'iodotriméthylsilane 95
III- Hydrogénolyse de dérivés iodés 97
IV- Méthode de Berthelot 98
V- Conclusion 99
VI- Partie expérimentale 100

CHAPITRE V
SPECTROMETRIE DE MASSE 102
I- Généralités..... 102
II- Conditions expérimentales 103
III- Identification d'acides et de diacides gras 104
III-1 Fragmentation des esters méthyliques d'acides et de diacides gras 104
III-2 Identification d'acides gras dans la fraction acide Fa 106
III-3 Identification d'α-ωdiacides 106
IV- Identification d'hydroxy-acides 109
IV-1 Spectres de masse d'ω-hydroxy-acides 109
IV-2 Spectres de masse d'α-ω diols 110
V- Identification de n-alcanes 111
VI- Identification d'alcools gras 112
VII- Identification de stéroïdes 112
VIII- Identification de triterpénoïdes 116
VIII-1 Famille du taraxérène 116
VIII-2 Famille de l'oléanane et de l'ursane (Δ 12) 118
VIII-3 Autres dérivés de l'ursane et dérivés du lupane 121
VIII-4 Hopanoïdes 123
VIII-5 Famille du friedelane et analogues 126
VIII-6 Dérivés du 9-19 cyclolanostane 129
VIII-7 Triterpénoïdes avec des méthyles en position 13 et 14 129
IX- Introduction directe 131
X- Ionisation chimique 135
XI- Ionisation par impact laser (LAMMA) 135
XII- Conclusion 136

CONCLUSIONS GENERALES ET DISCUSSION DES RESULTATS 158

page

ANNEXES 168
Annexe I : Indice d'iode 168
Annexe II : Indice de méthoxyle 168
Annexe III : Méthylation des fractions acides des cires 169
Annexe IV : Indice d'hydroxyle 170
Annexe V : Indice de carbonyle 170
Annexe VI : Préparation des sels de baryum 171
Annexe VII : Réduction de la fraction acide des cires 171
Annexe VIII : Silylation 171
Annexe IX : Paramètres d'intégration des chromatogrammes 172
Annexe X : Nomenclature des triterpénoïdes cités 172
Squelettes carbonés des stéroïdes et des triterpénoïdes ... 173
Annexe XI : Dérivés pour la CLHP 174

BIBLIOGRAPHIE 175

TABLE DES MATIERES 181

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ
022 079220 8