

## ■ Identification par CPG/SM des principaux acides gras constitutifs de la subérine du liège

J. Bleton, P. Mejanelle, S. Goursaud et A. Tchapla

LETIAM, IUT d'Orsay, plateau du Moulon, 91400 Orsay, France

The aim of this work was to verify the presence of cork (*Quercus Suber*) in two samples of linoleum of the beginning of the twentieth century. Using GC/MS after acidic methanolysis and silylation, it was possible to identify most of the components of a modern sample of cork. The dominant is a lipid polymer: the suberin. Its monomeric composition is examined in details.

Cette étude a été réalisée dans le but de vérifier la composition chimique de deux fragments de linoléums du début du siècle, l'un provenant de la Maison Pasteur à Arbois, l'autre de l'épave du Titanic. Entre 1860, date de leur invention, et 1950, date d'apparition de produits de remplacement de type vinylique, les linoléums étaient principalement constitués d'une toile de jute enduite d'un mélange d'huile de lin oxydée et de poudre de liège. L'huile de lin oxydée ayant déjà été analysée au laboratoire du fait de son emploi abondant dans le domaine de la peinture, il nous restait à caractériser la poudre de liège.

### Composition chimique du liège

Le liège de *Quercus Suber* est une substance très complexe. Sa composition chimique a été étudiée pour la première fois par Chevreul en 1815. De nombreux travaux lui ont été

consacrés par la suite avec des résultats souvent contradictoires.

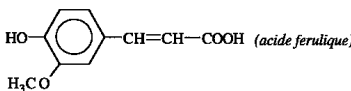
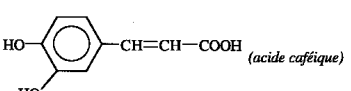
Les constituants directement extractibles à l'aide d'un solvant organique, donc non combinés, sont peu nombreux : il s'agit essentiellement de triterpènes pentacycliques dont le plus important est la friedeline.

Les autres constituants ne sont accessibles qu'à la suite de réactions de dépolymérisation et les résultats obtenus sont fortement liés aux procédés utilisés. En 1960, il était cependant possible d'inclure dans la liste des constituants du liège : le glycérol, la subérine, la lignine, la cellulose et d'autres polysaccharides [1].

La subérine, constituant principal du liège de *Quercus Suber*, est elle-même une substance originale très complexe. Dans les années 70 – 80, de nombreux biochimistes se sont intéressés à la subérine présente dans le liège de nombreuses espèces végétales au niveau de la tige ou des racines ainsi qu'à la cutine, substance voisine présente à la surface des feuilles ou des fruits. Ces deux substances jouent effectivement un rôle important dans la relation des plantes avec leur environnement. Leurs constituants sont actuellement assez bien connus, ce qui permet de les considérer comme des polymères lipidiques, mais leur structure macromoléculaire n'est pas encore établie de façon définitive [2,3].

Le tableau I présente les principaux constituants de la subérine du liège de *Quercus Suber*.

Tableau I. Principaux constituants de la subérine.

➤ Monoacides	<i>exemples:</i>
Saturés non hydroxylés	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
Saturés $\omega$ -hydroxylés	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$ ( <i>phellonique</i> )
Insaturés $\omega$ -hydroxylés	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Epoxydés $\omega$ -hydroxylés	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{HC} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Saturés trihydroxylés	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_7-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ $\text{OH} \quad \text{OH}$
➤ Diacides	
Saturés non hydroxylés	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$ ( <i>phellogénique</i> )
Insaturés	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Epoxydés	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7-\text{HC} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Saturés dihydroxylés	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ $\text{OH} \quad \text{OH}$
➤ Alcools	$\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CH}_3$
➤ Composés phénoliques:	
	 ( <i>acide ferulique</i> )
	 ( <i>acide caféique</i> )

### Préparation de l'échantillon

En vue de l'analyse CPG/SM, nous avons utilisé la méthode employée au laboratoire pour l'étude des gommés naturelles [4]. Elle comporte une étape de méthanolyse acide qui permet de couper les polysaccharides et une étape de silylation qui permet de rendre plus volatils les monosaccharides obtenus. Cette méthode est également appropriée à l'étude des corps gras, des cires et de certaines résines [5].

### Résultats

Nous avons d'abord analysé un échantillon de liège moderne. Le chromatogramme correspondant est présenté dans la figure 1.

Notre méthode de préparation de l'échantillon ne permet pas de dépolymériser complètement le liège. En effet, un résidu solide est observé en fin de méthanolyse. Après analyse, très peu de composés correspondent à la dégradation de la lignine. De même, la faible quantité de glucose observée ne reflète pas une attaque importante de la cellulose. Par contre, on observe bien une quantité importante de glycérol, un massif de sucres qui pourraient correspondre à de l'hémicellulose, des triterpènes dont le principal est la friedeline et tous les constituants connus de la subérine. Presque tous ces composés sont hydroxylés et leur transformation en déri-

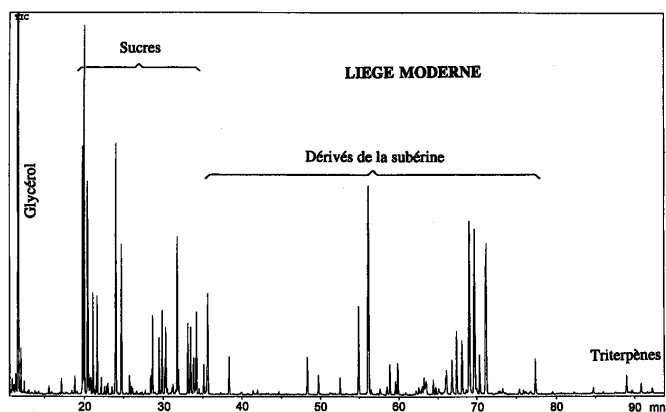


Figure 1. Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de liège moderne, après méthanolyse et silylation.

vés silylés s'avère très utile pour l'analyse CPG et l'identification en spectrométrie de masse.

La partie du chromatogramme correspondant à la subérine est agrandie dans la figure 2. L'indexation des pics, effectuée de façon à regrouper les composés par familles, fait référence au tableau II. Les composés ont pu être identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec les spectres figurant dans la banque de données NIST 62 ou décrits dans la littérature [6,7].

### Cas particulier des époxyacides

Les acides C18 époxydés représentent 30 à 40 % des monomères obtenus à partir de la subérine du liège de Quercus Suber [2]. Du fait de leur grande réactivité, leur existence a été l'objet de nombreuses controverses jusqu'au début des années 70. En effet le traitement de dépolymérisation généralement utilisé jusqu'alors était la saponification en milieu aqueux ou alcoolique suivie d'une acidification. Ce traitement transforme les acides époxydés en acides 9, 10, 18-trihydroxy-octanoïques ou 9, 10-dihydroxy-octanedioïques déjà présents dans le polymère. Par contre, en effectuant la dépolymérisation par chauffage au reflux avec un excès d'alcoolate de sodium dans l'alcool, Holloway a pu observer la formation d'alcoxyhydrines, dérivés spécifiques des époxyacides [8].

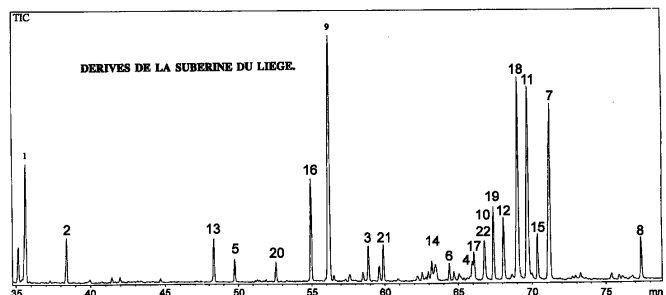


Figure 2. Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de liège moderne, après méthanolyse et silylation. Vue détaillée de la zone des dérivés de la subérine. Les pics numérotés sont identifiés dans le tableau II.

Tableau II. Constituants de la subérine du liège identifiés par CPG/SM après méthanolyse et silylation de l'échantillon. La numérotation correspond au chromatogramme de la figure 2. (Remarque : les composés hydroxylés sont observés sous leur forme silylée).

Composés phénoliques	Diacides
n° 1 Féruleate de méthyle	-saturés non hydroxylés
n° 2 Caféate de méthyle	n°13 hexadécanedioate de méthyle
<b>Monoacides</b>	n°14 eicosanedioate de méthyle
-saturés non hydroxylés	n°15 docosanedioate de méthyle (phellogénique)
n° 3 Docosanoate de méthyle	-insaturé
n° 4 Tétracosanoate de méthyle	n°16 octadécèn-9-dioate de méthyle
-saturés -hydroxylés	dérivés d'acide époxydé
n° 5 16-hydroxy hexadécanoate de méthyle	n°17 9-hydroxy-10-méthoxy-octadécanedioate de méthyle
n° 6 20-hydroxy eicosanoate de méthyle	n°18 9-chloro-10-hydroxy-octadécanedioate de méthyle
n° 7 22-hydroxy docosanoate de méthyle (phellonique)	-saturé dihydroxylé
n° 8 24-hydroxy tétracosanoate de méthyle	n°19 9,10-dihydroxy-octadécanedioate de méthyle
-insaturé -hydroxylé	(phloionique)
n° 9 18-hydroxy-octadécèn-9-oate de méthyle	<b>Alcools</b>
-dérivés d'acide époxydé	n°20 Eicosanol
n°10 10,18-dihydroxy-9-méthoxy-octadécanoate de méthyle	n°21 Docosanol
+ 9,18-dihydroxy-10-méthoxy-octadécanoate de méthyle	n°22 Tétracosanol
n°11 9-chloro-10,18-dihydroxy-octadécanoate de méthyle	
+ 10 chloro 9,18 dihydroxy octadécanoate de méthyle	
-saturé trihydroxylé	
n°12 9,10,18-trihydroxy-octadécanoate de méthyle (phloionolique)	

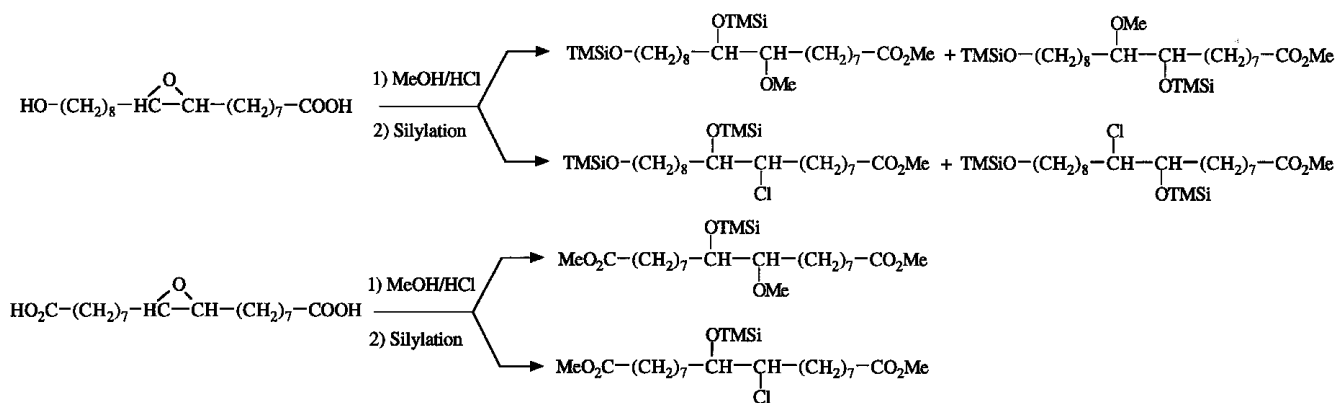


Figure 3. Évolution des époxyacides après méthanolyse acide et silylation.

Lors de la méthanolyse acide, le groupe époxy est entièrement transformé en méthoxyhydrine d'une part et en chlorhydrine d'autre part, la deuxième espèce étant largement majoritaire. L'acide 9, 10-époxy-18-hydroxy-octadécanoïque conduit à deux isomères de chaque espèce. Dans nos conditions chromatographiques, les isomères silylés correspondants ne sont pas séparés. Du fait de sa symétrie, l'acide 9, 10-époxy-octadécanedioïque conduit à un seul composé de chaque espèce.

Les réactions correspondantes sont présentées dans la figure 3. Les méthoxyhydrines et les chlorhydrines (Nos. 10, 11, 17, 18) ont pu être identifiées par comparaison de leurs spectres de masse avec les données de la littérature [8].

Lors de cette première analyse, nous avons pu identifier tous les constituants connus de la subérine du liège de Quercus Suber. Parmi eux figurent de nombreux marqueurs spécifiques qui permettent de détecter la présence de liège dans les produits manufacturés qui le contiennent.

La même méthode d'analyse appliquée aux deux échantillons de linoléums anciens a conduit aux chromatogrammes représentés dans les figures 4 et 5. Dans les deux cas nous avons pu retrouver l'empreinte chromatographique du liège pratiquement inchangée, superposée à l'empreinte de l'huile de lin oxydée [9].

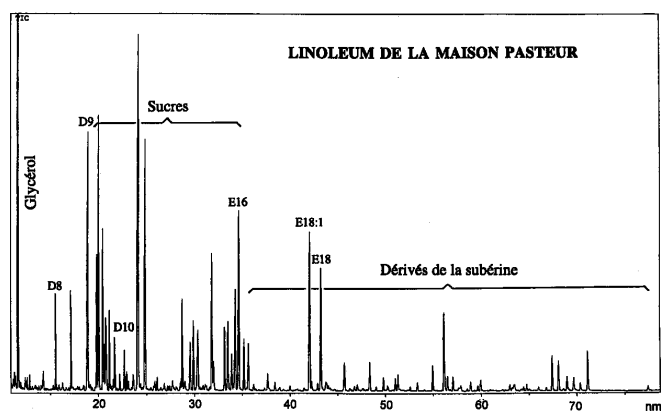


Figure 4. Chromatogramme obtenu à partir d'un fragment de linoléum de la Maison Pasteur, après méthanolyse et silylation. D8 à D10 : esters méthyliques des diacides en C8, C9, C10 ; E16, E18, E18:1 : esters méthyliques des acides en C16, C18, C18:1.

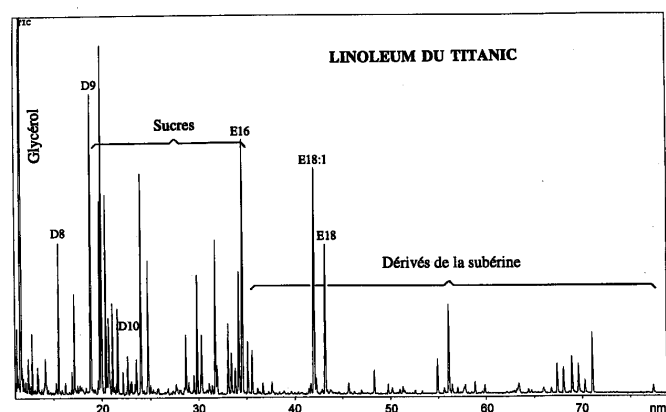


Figure 5. Chromatogramme obtenu à partir d'un fragment de linoléum du Titanic, après méthanolyse et silylation. D8 à D10 : esters méthyliques des diacides en C8, C9, C10 ; E16, E18, E18:1 : esters méthyliques des acides en C16, C18, C18:1.

## Conclusion

Une seule analyse CPG/SM réalisée après méthanolyse acide et silylation d'un échantillon d'environ 2 mg de liège nous a permis d'identifier, entre autres, les principaux constituants de la subérine considérée comme un polymère lipidique. Nous avons pu compléter ainsi notre banque de données concernant les acides gras hydroxylés ou époxydés fréquemment rencontrés dans les substances naturelles.

Par la même méthode, la présence de liège dans deux échantillons de linoléums anciens a pu être établie de façon incontestable.

## Partie expérimentale

### Préparation des échantillons

2 mg de matière ont été traités en deux étapes successives :  
 • méthanolyse acide en présence de HCl 0,4 M à 80 °C pendant 24 heures  
 • triméthylsilylation à 80 °C pendant 2 heures par un mélange Pyridine/HMDS/TMCS (9/3/1, v/v/v).

### Conditions analytiques

#### Appareillage

Chromatographe SHIMADZU GC-17A couplé à un spectromètre de masse de type quadripolaire SHIMADZU QP 5000.

#### Conditions chromatographiques

Colonne DB5 (J. & W.) (5 % phényl, 95 % méthylsiloxane ; 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) ; gaz vecteur helium (50 Kpa) ; injection splitless (T.inj. : 300 °C) ;

programmation four : de 40 °C à 130°C à 9 °C/mn puis de 130 °C à 290 °C à 2 °C/mn ; pallier de 10 mn à 290 °C.

#### Spectrométrie de masse

Ionisation par impact électronique à 70 eV ; acquisition entre les rapports  $m/z$  29 et 650 avec une périodicité de 2 s ; température de source : 160 °C.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier la société Touzard & Matignon pour le prêt d'une unité CPG/SM Shimadzu QP 5000 avec laquelle les analyses ont été effectuées.

## Références

- Guillemonat, A. *Ann. Fac. Sci. Marseille* **1960**, 30, 43-54.
- Holloway, P. J. *Phytochemistry* **1983**, 22, 495-502.
- Kolattukudy, P. E. *Science* **1980**, 208, 990-1000.
- Bleton, J.; Mejanelle, P.; Sansoulet, J.; Goursaud, S.; Tchaplà, A. *J. Chromatogr. A* **1996**, 720, 27-49.
- Mejanelle, P.; Bleton, J.; Goursaud, S.; Tchaplà, A. *Analisis* **1996**, 24-7, M16-20.
- Eglinton, G.; Hunneman, D. H.; McCormick, A. *Org. Mass Spectrom.* **1968**, 1, 593-611.
- Eglinton, G.D.; Hunneman, H. *Phytochemistry* **1968**, 7, 313-322.
- Holloway, P. J.; Brown Deas, A. H. *Phytochemistry* **1973**, 12, 1721-35.
- Pennec, S. L.; Wozniak, R.; Tchaplà, A.; Bleton, J. *ICOM Comm. Cons.* **1996**, 2, 952-960.