

## MISE EN EVIDENCE DE L'OXYDATION PAR LE RAT D'UN HYDROCARBURE NAPHTENIQUE, LE DODECYLCYCLOHEXANE

J. TULLIEZ and J. C. PELERAN

*Laboratoire de Recherches sur les Additifs Alimentaires INRA, 180, Chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse, France*

Received 31 January 1977

### SUMMARY

Naphthenic hydrocarbons, mainly of fossil origin, are widespread in our environment, and contaminate the food chains; they are also used as food additives. Their fate in mammals is unknown, except for the fact that they are absorbed and accumulate in tissues. Only a few microorganisms have been shown capable of oxidising *n*-alkyl substituted cycloparaffins. In this study, dodecylcyclohexane has been chosen as a typical monocycloparaffin, and has been administered orally to rats. The GLC and GLC-MS analysis of the methylesters of body and hepatic fatty acids led to the identification of cyclohexyldodecanoic and its decanoic and octanoic homologs. The alkyl chain undergoes a terminal oxidation followed by the classical  $\beta$ -oxidation process. After administration of one 200 mg dose, or incorporation of 0.1% of the cycloparaffin in the diet for 2 months, these acids were found at low levels in neutral lipids and phospholipids. Their subsequent metabolic pathway and their possible interaction with the biochemical mechanisms involving phospholipids are under investigation.

### 1. Introduction

Les hydrocarbures naphténiqes, termes lourds de la série des hydrocarbures alicycliques, sont abondants dans les bruts pétroliers et certains produits dérivés, telles les huiles blanches. L'homme utilisant celles-ci tant en technologie alimentaire, qu'à titre diététique ou thérapeutique, se trouve ainsi au contact de substances dont on sait qu'elles sont absorbées et qu'elles peuvent s'accumuler dans certains tissus [1]. Toutefois, le devenir métabolique des hydrocarbures alicycliques saturés chez les mammifères est mal connu, excepté chez le Lapin et pour les termes les plus simples tels le cyclohexane [2], le méthyl-cyclohexane [3] et la décaline [4] qui sont hydroxylés puis éliminés sous forme de glucuronides. Seuls quelques microorganismes du sol, du genre *Mycobactérium* et *Nocardia*, sont susceptibles d'oxyder les hydrocarbures naphténiqes tels que le dodécylcyclohexane ou l'heptadécylcyclohexane [5], et de les incorporer dans leurs lipides sous forme d'acides gras  $\omega$ -cyclohexyl substitués.

Ayant montré que le dodécylcyclohexane et l'heptadécylcyclohexane sont largement absorbés [6]

pour de faibles doses alimentaires (0.1%) et peuvent s'accumuler chez le Rat [7], il semblait intéressant de rechercher si les mammifères possédaient les systèmes oxydatifs susceptibles de métaboliser de telles molécules. Le dodécylcyclohexane a été choisi comme modèle de monocycloparaffine, famille qui peut représenter 20 à 25% des huiles blanches.

### 2. Matériel et méthodes

Des rats mâles (Wistar) de 200 g environ reçoivent ad libitum un régime semi-synthétique à base de caséine; le dodécylcyclohexane (Koch-Light Laboratories) est incorporé à l'aliment, en solution dans l'huile d'arachide entrant dans la composition du régime, afin d'en améliorer l'absorption.

D'une part, des animaux reçoivent une dose unique de 200 mg dans la ration journalière, puis sont abattus après 24 h; le foie, et du tissu adipeux, sont prélevés. D'autre part, des rats reçoivent durant deux mois un régime renfermant 0.1% de dodécylcyclohexane; les carcasses entières sont broyées puis lyophilisées.

Les lipides totaux obtenus selon la méthode de Folch sont séparés en lipides neutres et lipides complexes sur colonne de silice. Les esters méthyliques des acides gras de chaque classe sont préparés par transméthylation, purifiés sur couche mince de silice (élution hexane/éther éthylique 90 : 10) puis séparés en fonction de leur degré d'insaturation sur plaque de silice imprégnée de 20% de nitrate d'argent (élution chloroforme/éthanol 99 : 1).

L'acide cyclohexyldodécanoïque est recherché parmi les acides gras saturés suivant la méthode de Firestone [8], modifiée par Potteau [9], utilisant la complexation des esters méthyliques par l'urée. Les esters non complexés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne polaire (DEGS-PS à 10% sur Supelcoport 80/100) et apolaire (DEXSIL 300 à 3% sur chromosorb W AW DMCS 80/100). Leurs temps de rétention sont comparés à ceux des esters méthyliques des acides cyclohexyl-acétique et propionique (Fluka), ainsi que des acides cyclohexyl-butyrique et undécanoïque préparés par hydrogénation catalytique des acides phényl-butyrique (K et K laboratories) et phénylundécanoïque (Eastman Kodak). La confirmation des structures moléculaires est envisagée au moyen du couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

### 3. Resultats et discussion

La chromatographie en phase gazeuse de la fraction des esters méthyliques non complexée par l'urée a

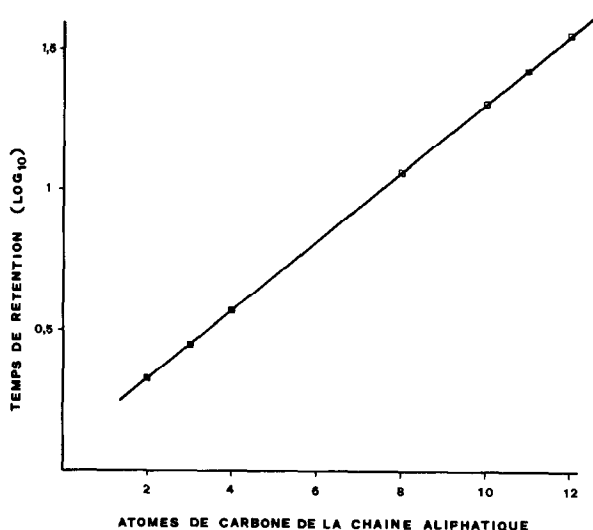


Fig.1. Relation entre les temps de rétention des ester méthyliques des acides gras  $\omega$ -cyclohexyl substitués et la longueur de la chaîne aliphatique. (■) Acides  $\omega$ -cyclohexyl substitués standards. (□) Acides isolés du foie des rats ayant ingéré du dodécylcyclohexane.

permis de détecter trois composés que l'on ne trouve pas dans les lipides hépatiques des animaux témoins. Sur colonne apolaire, leurs temps de rétention sont voisins de ceux des acides gras saturés  $C_{15}$ ,  $C_{17}$  et  $C_{19}$ ; sur colonne polaire, leurs temps de rétention sont légèrement supérieurs à ceux des esters méthyliques des acides palmitique, stéarique et arachidique. La fig.1 montre d'autre part que sur cette colonne, les

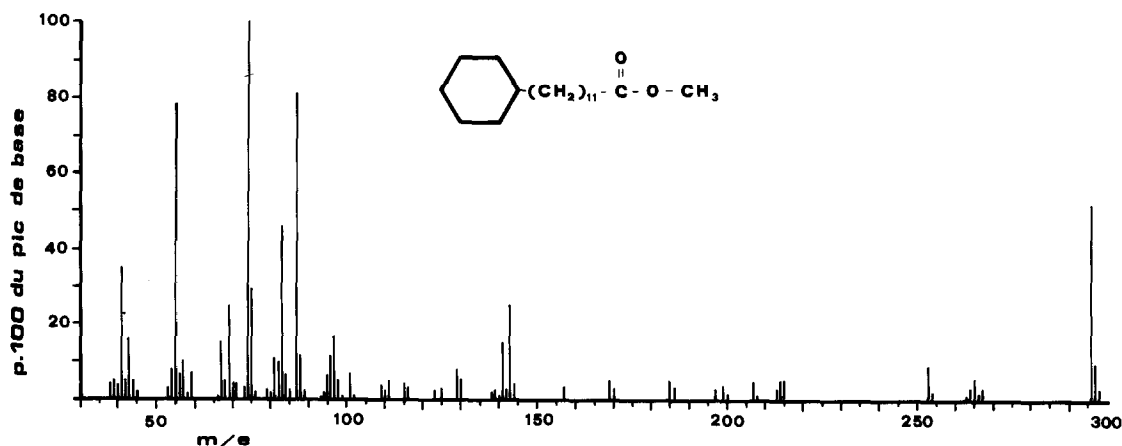


Fig.2. Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide cyclohexyl-dodécanoïque isolé du foie de rats ayant ingéré du dodécylcyclohexane.

trois substances prennent place dans la série homologue des esters méthyliques des acides gras  $\omega$ -cyclohexyl substitués; leurs temps de rétention correspondent respectivement à ceux des acides  $\omega$ -cyclohexyl-octanoïque, -décanoïque et dodécanoïque.

Les spectres de masse (fig.2) indiquent la présence des pics moléculaires 240, 268 et 296. L'ion  $C_6H_{11}^+$  ( $m/e = 83$ ) caractéristique du noyau cyclohexanique existe dans les trois spectres, et les fragments 41, 55, 69 et 97 confirment la structure monocycloparaffinique. Enfin, la fragment 74 révèle, compte-tenu du réarrangement de Mc Lafferty, l'existence de la fonction ester méthylique. Les trois substances correspondent donc bien aux acides  $\omega$ -cyclohexylsubstitués nommés plus haut.

Le Rat possède donc les systèmes enzymatiques permettant l'oxydation terminale de la chaîne aliphatique du dodécylcyclohexane. La présence des homologues inférieurs, décanoïque et octanoïque, de l'acide cyclohexyldodécanoïque, indique que celui-ci est ensuite  $\beta$ -oxydé. De même que Beam et Perry [5] retrouvaient de l'acide cyclohexylacétique dans le milieu de culture des microorganismes utilisant le dodécylcyclohexane, on peut penser que la poursuite de l'oxydation de la chaîne latérale puisse conduire à cette même substance, dont les voies métaboliques sont inconnues chez les Mammifères.

Les acides atypiques, qui n'entrent que pour une faible part dans la composition en acides gras du foie des rats abattus 24 h après l'ingestion de 200 mg d'hydrocarbure, ont été mis en évidence tant dans les lipides neutres que dans les phospholipides. On les retrouve seulement en faible quantité dans les lipides de la carcasse des rats ayant reçu 0.1% de dodécylcyclohexane durant deux mois, bien qu'à ce taux,

l'absorption de l'hydrocarbure soit supérieure à 90% [6]. Cependant, même faiblement incorporés quantitativement dans la totalité de la carcasse, on ne peut écarter à priori la possibilité d'une perturbation de certains mécanismes biochimiques du fait de l'intégration de ces acides gras particuliers dans les phospholipides.

### Remerciements

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par M. Rigaud et P. Dubois, Station de Technologie des Produits Végétaux, INRA, Dijon, France. Le travail a été effectué avec l'aide du Ministère de la Qualité de la Vie et de l'Environnement (Contrat 73-45).

### Références

- [1] Boitnott, J. K. and Margolis, S. (1970) *Hopkins Med. J.* 127, 65–78.
- [2] Elliott, T. H., Parke, D. V. and Williams, R. T. (1959) *Biochem. J.* 72, 193–200.
- [3] Elliott, T. H., Tao, R. C. C. and Williams, R. T. (1965) *Biochem. J.* 95, 70–76.
- [4] Elliott, T. H., Robertson, J. S. and Williams, R. T. (1966) *Biochem. J.* 100, 403–406.
- [5] Beam, H. W. and Perry, J. J. (1974) *J. Bacteriol.* 118, 394–399.
- [6] Tulliez, J. et Bories, G. (1975) *Ann. Nutr. Alim.* 29, 201–211.
- [7] Tulliez, J. et Bories, G. (1975) *Ann. Nutr. Alim.* 29, 213–221.
- [8] Firestone, D., Nesheim, S. and Horwitz, W. (1961) *J. Assoc. Agric. Chem.* 44, 465–474.
- [9] Potteau, B. (1976) *Ann. Nutr. Alim.* 30, 89–93.