



LE DOSAGE DES ACIDES GRAS VOLATILS DU BEURRE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

par

Simone KUZDZAL-SAVOIE et W. KUZDZAL

*Station centrale de recherches laitières et de technologie
des produits animaux, Jouy-en-Josas (Yvelines).*

Nous avons comparé les résultats obtenus dans le dosage des acides gras volatils du beurre, par deux méthodes différentes, retenues pour leur simplicité.

La première méthode a été indiquée par de Francesco et al. en 1961. Elle consiste à préparer les esters méthyliques des acides gras du beurre, par transestérification, dans une ampoule scellée. Une partie aliquote du contenu de l'ampoule est ensuite directement injectée dans le chromatographe. Cette méthode a été améliorée en 1963 par Morgantini, par l'utilisation de la programmation de température ; sous une forme légèrement différente elle a été également proposée par de Man (1964). Les résultats sont exprimés pour les divers acides en p. 100 de la surface totale du chromatogramme.

La seconde méthode (Roos et al., 1963) consiste à analyser directement, par chromatographie en phase gazeuse, les acides gras libérés (dans une enceinte fermée) par acidification des savons préparés antérieurement à partir de la matière grasse. L'addition d'un étalon interne permet l'obtention de résultats pondéraux.

Dans la présente étude l'analyse par chromatographie en phase gazeuse a été conduite dans des conditions isothermes ; un détecteur à ionisation de flamme a été seul utilisé, et tous les essais ont porté sur le même échantillon de beurre.

I. — Aspect des chromatogrammes

A) Méthode de Francesco et al. (1961).

La figure 1 représente un chromatogramme des esters méthyliques des acides gras volatils du beurre obtenu par la méthode italienne. Le pic du butyrate de méthyle apparaît nettement séparé du pic de l'alcool méthylique qui le précède, mais au-dessus de 120° C, dans nos conditions expérimentales, les deux pics ne se discernent plus.

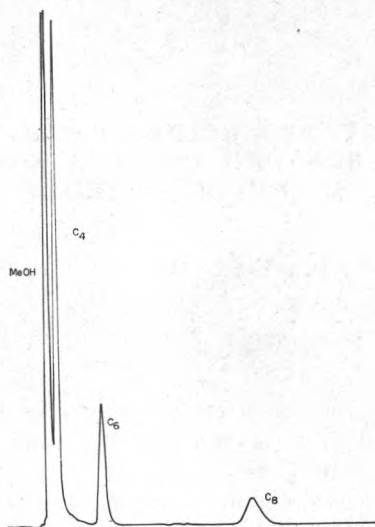


Fig. 1. — Chromatogramme des acides volatils du beurre (selon Francesco et al., 1961). — Aerograph HyFi 600 D. — Colonne : 3 m — 0,3 cm — chargée à 10 p. 100 de DEGS sur chromosorb W lavé aux acides, 80/100 mesh. Température : 80° C. — Débit du gaz vecteur : 30 ml/mn, N₂.

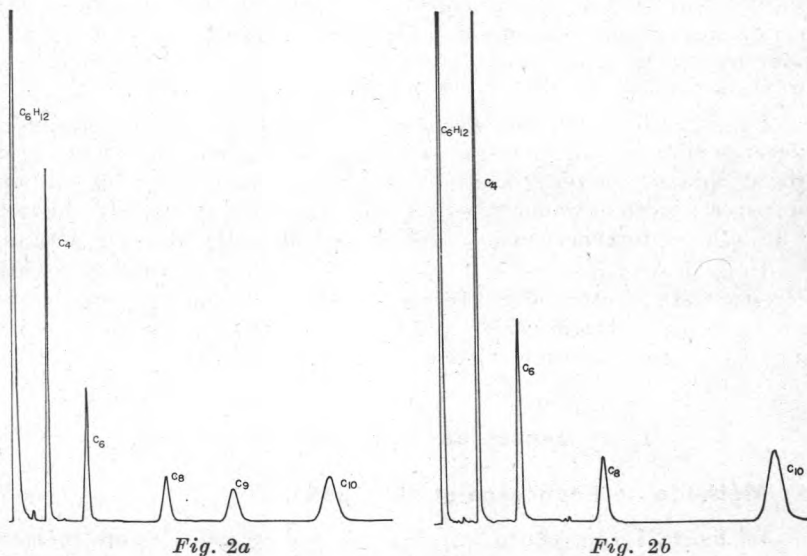


Fig. 2. — Chromatogrammes des acides volatils du beurre (selon Roos et al., 1963), avec et sans étalon interne (C₉). — Colonne : 1,5 m — 0,3 cm — chargée à 10 p. 100 de DEGS additionné de 2 p. 100 d'acide phosphorique sur brique à feu 80/100 mesh. — Température : 165° C. — Débit du gaz vecteur : 30 ml/mn, N₂.

TABLEAU I

DOSAGE DES ACIDES VOLATILS DU BEURRE N° 6/3 (Surgères, mai 1966)
(méthode Francesco et al., 1961)
RÉSULTATS EXPRIMÉS EN P. 100 DE LA SURFACE DES PICS DE C₄ A C₁₀ INCLUS

	<i>Essai I</i>					<i>Essai II</i>			<i>Moyenne</i>
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	
C ₄	44	48	50	45	47	48	49	48	47
C ₆	22	19	17	18	22	22	19	19	20
C ₈	9	13	9	11	9	10	12	13	11
C ₁₀	25	20	23	26	22	20	20	20	22

B) Méthode de Roos et al. (1963).

La figure 2 représente deux chromatogrammes d'acides gras volatils du beurre avec et sans addition d'étalon interne. Les pics représentatifs du solvant et de l'acide butyrique sont très distants l'un de l'autre.

II. — Etude de la méthode de Francesco et al. (1961)

Nous n'avons pas obtenu par cette méthode et dans nos conditions expérimentales une bonne reproductibilité des résultats comme en témoigne le tableau I.

Des résultats cohérents (dans la limite de reproductibilité indiquée dans le tableau I), ne sont obtenus que si, d'une part, après estérification, le mélange en ampoule ne constitue qu'une seule phase et si d'autre part, sur les chromatogrammes obtenus, le pic de l'alcool méthylique est nettement supérieur au pic du butyrate de méthyle. Ces conditions sont réalisées lorsque la méthode de Francesco et al. (1961) est exactement suivie.

Dans l'échantillon de beurre analysé, les surfaces relatives moyennes des pics des acides butyrique (C₄), caproïque (C₆), caprylique (C₈) et caprique (C₁₀) exprimées en p. 100 de la surface totale des pics des quatre acides (analysés sous forme de leurs esters méthyliques) peuvent s'exprimer ainsi :

ac. butyrique	47,5 p. 100
ac. caproïque	20,0 p. 100
ac. caprylique	11,0 p. 100
ac. caprique	21,5 p. 100

Les auteurs italiens ne semblent pas utiliser de facteur de correction lors du calcul des proportions relatives des acides à bas poids moléculaire. Cependant si Ettre et Kabot (1963) ont montré que la réponse relative pour un poids égal des esters méthyliques des acides de 8 à 20 atomes de carbone était pratiquement égale

à 100 p. 100, avec le détecteur à ionisation de flamme, la question concernant les esters méthyliques des acides possédant moins de 8 atomes de carbone ne paraît pas avoir reçu de réponse.

III. — Etude de la méthode de Roos et al. (1963).

Les résultats obtenus par la méthode de Roos et al. (1963) sur le même échantillon de beurre que celui utilisé au cours de l'essai précédent sont portés dans les tableaux II et III.

TABLEAU II

DOSAGE DES ACIDES GRAS VOLATILS DU BEURRE N° 6/3 (Surgères, mai 1966)
(Méthode Roos et al., 1963.)

1^{re} SÉRIE : RÉSULTATS EXPRIMÉS (SANS FACTEUR DE CORRECTION) EN MG D'ACIDES
POUR 2 G DE MATIÈRE GRASSE

	<i>Essai I</i> C ₉ = 29,8 mg	<i>Essai II</i> C ₉ = 29,7 mg	<i>Essai III</i> C ₉ = 51,4 mg	<i>Essai IV</i> C ₉ = 50,7 mg	<i>Moyenne en poids</i>	<i>Moyenne en p. 100</i>
C ₄	57,0 — 55,4	59,4 — 58,3 — 57,8	58,1 — 56,9	56,1 — 56,3	57,3	31,3
C ₆	38,0 — 40,5	41,6 — 43,4 — 42,1	41,9 — 43,5	41,4 — 42,2	41,6	22,7
C ₈	28,0 —	— 29,8 — 31,3	29,9 — 30,0	28,5 — 28,2	29,4	16,0
C ₁₀	56,0 — 57,5	53,4 — 53,3 — 56,1	— —	55,2 — 53,5	55,0	30,0

La fidélité de la méthode hollandaise est supérieure à celle de la méthode italienne. Toutefois la reproductibilité qui ressort des tableaux II et III est moins bonne que celle qui ressort du tableau publié par les auteurs (Roos et al., 1963).

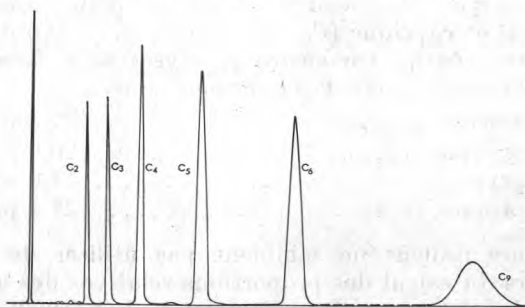


Fig. 3. — Chromatogramme obtenu à partir d'un mélange d'acides gras purs. C₉ = 62 mg. — Même colonne qu'en fig. 2. — Température : 125° C.

TABLEAU III

DOSAGE DES ACIDES GRAS VOLATILS DU BEURRE N° 6/3 (Surgères, mai 1966)
(Méthode Roos et al., 1963.)

2° SÉRIE : RÉSULTATS EXPRIMÉS (SANS FACTEUR DE CORRECTION) EN POURCENTAGE
DE LA SURFACE DES PICS DES ACIDES DE C₄ A C₁₀ INCLUS

		a	b	c	d	e	f	Moyenne par essai	Moyenne générale
<i>Essai I</i> (sans C ₉)	C ₄	31,3	31,0	33,3	33,5	32,2	32,7	32,3	C ₄ = 31,0 C ₆ = 23,0 C ₈ = 15,8 C ₁₀ = 30,2
	C ₆	21,8	24,3	22,2	23,4	24,1	24,1	23,3	
	C ₈	14,7	14,6	14,8	14,6	17,5	15,5	15,3	
	C ₁₀	32,2	30,2	29,6	28,5	26,2	27,8	29,1	
<i>Essai II</i> (C ₉ (1) = 37 mg)	C ₄	30,2	30,1	29,7	29,4			29,9	
	C ₆	23,3	23,3	22,2	22,7			22,9	
	C ₈	16,3	15,5	15,4	17,4			16,1	
	C ₁₀	30,2	31,1	32,7	30,3			31,1	
<i>Essai III</i> (C ₉ (1) = 28,6 mg)	C ₄	31,2	30,2	31,8	30,1			30,8	
	C ₆	23,4	23,4	22,0	22,6			22,9	
	C ₈	14,9	15,8	15,9	15,5			15,8	
	C ₁₀	30,5	30,6	30,3	30,8			30,5	

(1) L'acide pélargonique ajouté n'intervient pas dans le calcul.

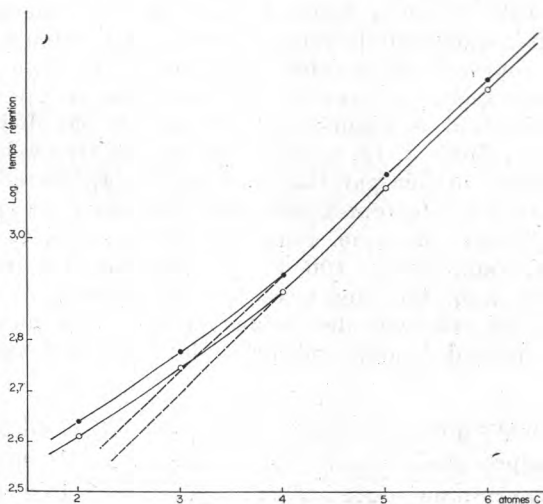


Fig. 4. — Variation du logarithme des temps de rétention (temps de rétention de l'air = 0) en fonction du nombre d'atomes de carbone des acides. —
• essai I — ◻ essai II

Les valeurs portées dans les tableaux II et III ont été obtenues sans utiliser de facteur de correction.

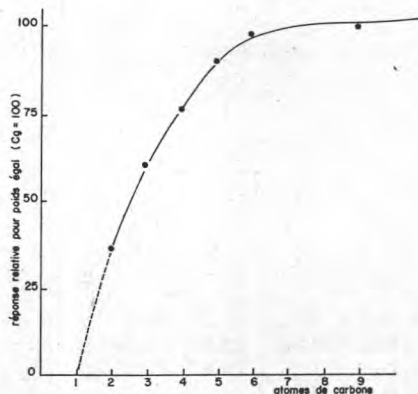


Fig. 5. — Variation de la réponse relative des acides gras volatils pour un poids égal, par rapport à l'acide pélagonique (réponse = 100).

Nous avons à partir d'un mélange d'acides gras purs, calculé les réponses relatives des acides à bas poids moléculaire, par rapport à l'acide pélagonique. L'analyse directe d'un mélange d'acides gras est présentée sur la figure 3 et l'on a porté sur la figure 4 la variation du logarithme du temps de rétention (calculé par rapport à l'air) en fonction du nombre d'atomes de carbone des acides. Les réponses relatives des divers acides par rapport à l'acide pélagonique (dont la réponse est 100 p. 100 par définition) sont portées sur la figure 5. La courbe obtenue est très voisine de celle antérieurement publiée par Kabot et al. (1964). On confirme ainsi que la réponse du détecteur à ionisation de flamme est pratiquement nulle pour l'acide formique. Pour l'acide butyrique la réponse est approximativement 80 p. 100, ce qui correspond à un facteur de correction de 1,25. En tenant compte de ce facteur de correction, les proportions relatives des acides de C₄ à C₁₀ dans le beurre analysé et précédemment indiquées dans les tableaux II et III deviennent :

ac. butyrique	36,2 p. 100
ac. caproïque	21,0 p. 100
ac. caprylique	14,8 p. 100
ac. caprique	28,0 p. 100

IV. — Discussion

Les différences constatées entre les résultats obtenus par chacune des deux méthodes ne peuvent être attribuées aux modes d'expression différents (en p. 100 d'acides ou en p. 100 d'esters méthyliques).

D'où proviennent-elles ?

La réponse relative du butyrate de méthyle n'est pas connue avec précision, dans le cas du détecteur à ionisation de flamme. Cependant compte tenu des travaux de Ettre et Kabot (1963) il ne semble pas que cette réponse relative puisse être supérieure à 100 p. 100.

Serait-ce alors qu'une perte d'acide butyrique interviendrait au cours de l'exécution de la méthode de Roos et al. (1963) ? Nous ne le pensons pas. Si une perte est possible lors de l'évaporation des savons de sodium elle n'atteint que les sels de l'acide acétique, peut-être légèrement ceux de l'acide propionique (Cf. Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal, 1967).

Selon nous les valeurs réelles seraient bien celles obtenues par la méthode de Roos et al. (1963).

A l'appui de cette affirmation un argument peut être tiré des résultats fournis par Francesco et al. (1961) d'une part et par Roos et al. (1963) d'autre part, à la suite d'analyses portant sur un grand nombre d'échantillons.

Au cours de l'année la proportion de l'acide butyrique varie, selon Roos et al. (1963) de 2,8 à 3,3 (en g pour 100 g de matière grasse). Les auteurs italiens, indiquent un taux d'acide butyrique (exprimé en p. 100 des esters totaux) moyen de 4,01 avec des valeurs extrêmes de 3,34 et 5,56.

Si l'on exprime les proportions d'acide butyrique indiquées par Roos et al., non plus pour 100 g de matière grasse mais pour 100 g d'acides totaux du beurre (en considérant que les acides gras du beurre représentent approximativement 85 p. 100 de la matière grasse totale) on obtient 3,3 et 3,8 comme valeurs extrêmes observées au cours de l'année. Ces valeurs restent inférieures aux valeurs obtenues par les auteurs italiens.

La méthode italienne donnerait-elle systématiquement un taux d'acide butyrique en excès ?

Dans une étude en cours nous avons choisi d'utiliser la méthode de Roos et al. (1963) pour déterminer les proportions respectives des acides à bas poids moléculaire dans de nombreux échantillons de beurre.

La méthode italienne resterait cependant la méthode de choix pour l'étude des acides gras du beurre puisqu'aussi bien la préparation des esters que l'analyse chromatographique revêtent la plus grande simplicité.

Il nous paraît toutefois préférable de l'étudier à nouveau avant de l'adopter systématiquement.

Résumé

La méthode de Francesco et al. (1961) et la méthode de Roos et al. (1963), qui permettent toutes deux le dosage des acides gras volatils du beurre, ont été étudiées comparativement.

La première méthode conduit à un taux d'acide butyrique sensiblement supérieur au taux trouvé par la seconde méthode.

La méthode de Roos et al. permet d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats que la méthode de Francesco et al. Cette dernière présente par contre des avantages de simplicité et de rapidité.

L'avantage de fidélité qui caractérise la méthode de Roos et al., nous a conduit à choisir cette méthode dans une étude en cours sur les limites de variation des proportions relatives des acides gras à bas poids moléculaire du beurre.

Summary

The methods of Francesco et al. (1961) and Roos et al. (1963) for determining the volatile fatty acids in butter have been compared.

Results found by the first method show a higher percentage of butyric acid than those found by using the second method.

Results may be reproduced more clearly by the method of Roos et al., but the method of Francesco et al. is more simple and rapid.

Because of its accuracy, we preferred to use the former method, in some research in progress on the variation limits of the relative proportions of low molecular fatty acids in butter.

RÉFÉRENCES

- ETTRE (L. S.) et KABOT (F. J.), 1963. Relative response of fatty acid methyl esters on the flame ionization detector. *J. Chromatog.*, **11**, 114.
- FRANCESCO (F. de), AVANCINI (D.), MAGLITTO (C.) et GANDINI (C.), 1961. Cromatografia quantitativa in F. V. Nota III. Composizione degli acidi del grasso del latte di vacca. *Riv. ital. sostanze grasse*, **38**, 307.
- KABOT (F. J.), AVERILL (W.) et ETTRE (L. S.), 1964. Gas chromatographic analysis of free fatty acids. *Riv. ital. sostanze grasse*, **41**, 121.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.) et KUZDZAL (W.), 1967. Les acides gras libres du fromage. *Le Lait*, **47**, 9.
- MAN (J. M. de), 1964. Determination of the fatty acid composition of milk fat by dual column temperature programmed gas liquid chromatography. *J. Dairy Sci.*, **47**, 546.
- MORGANTINI (M.), 1963. Analisi di burri e grasse volatili par gas-chromatografia a temperatura programmata. *Riv. ital. sostanze grasse*, **40**, 49.
- ROOS (J. B.), VERSNEL (A.) et WERDMULLER (G. A.), 1963. Die gaschromatographische Bestimmung der niederen Fettsäuren von Milchfett und deren Anwendung zum Nachweis von Fremdfetten. *Kieler Milchwirts. Forschungs.*, **15**, 515.