

Note technique

Dosage des acides gras libres

par

S. KUZDZAL-SAVOIE, W. KUZDZAL et D. LANGLOIS

*Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits Animaux
I.N.R.A. Jouy-en-Josas (78)*

PREMIÈRE PARTIE

METHODE GENERALE D'ANALYSE D'UN MELANGE D'ACIDES GRAS LIBRES ET D'ACIDES GRAS ESTERIFIES

Lorsqu'on étudie les lipides des produits laitiers on se trouve souvent en présence d'un mélange de glycérides et d'acides gras libres.

On propose ici une méthode générale de dosage et d'analyse des acides gras présents sous forme libre et sous forme estérifiée qu'ils soient volatils ou non volatils. On envisage également la possibilité d'un fractionnement des acides gras libres.

A un mélange de matière grasse (glycérides) (2 g par exemple) et d'acides gras libres dissous dans 50 ml d'hexane et placés dans une ampoule à décantation on ajoute 100 ml d'un mélange 50/50 (v/v) d'éthanol et d'eau (a), ou d'éthanol et de solution aqueuse de carbonate acide de sodium à 1 p.100 (b) ou d'éthanol et de solution aqueuse de carbonate neutre de potassium à 5 p.100 (c), ou d'éthanol et de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10 (d). Ces deux dernières modalités permettent une neutralisation et une extraction complète des acides gras libres, alors que les précédentes permettent une extraction sélective ou préférentielle de certains d'entre eux. On peut procéder si on le désire à l'utilisation successive des diverses modalités proposées. On peut aussi d'ailleurs en imaginer d'autres. Après agitation on laisse reposer et l'on décante la solution hydroalcoolique employée lors de la première extraction et on rassemble les fractions hydroalcooliques. A ces solutions on ajoute 25 ml d'hexane, lesquels après agitation et décantation sont réunis à la solution hexanique. Cette solution est lavée à l'eau.

On dispose donc de deux solutions : une solution hydroalcoolique (neutre ou alcaline) et une solution hexanique.

I. — Premier cas : absence d'acides gras volatils

1) *La solution hydroalcoolique* est acidifiée par 20 ml (environ) d'une solution d'acide sulfurique au 1/3 et les acides gras libérés sont extraits par 50 ml d'hexane. L'extraction est répétée une seconde fois (20 ml d'hexane). L'hexane est évaporé. Le résidu est pesé. Les acides gras sont ensuite transformés en esters méthyliques par addition d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 3 p. 100 (p/v), 1,6 p. 100 (v/v). Une variante consiste à ajouter à la solution hydroalcoolique une quantité connue d'un étalon interne tel l'acide heptadécanoïque ou même l'acide pélargonique. Il est alors inutile de peser les acides gras.

2) *La solution hexanique*

a) Si l'on a utilisé les modalités (c) ou (d) les acides gras libres sont tous neutralisés et la solution hexanique ne contient plus que des glycérides. L'hexane est alors évaporé, le résidu est pesé et additionné de quelques ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,35 p. 100 (p/v) par exemple, en vue d'obtenir par transestérification la transformation des acides gras des glycérides en esters méthyliques.

b) Si l'on a utilisé les modalités (a) ou (b), des acides gras libres peuvent être encore présents dans la phase hexanique à côté des glycérides.

α) Si on ne s'intéresse pas à leur extraction sélective et que l'on désire seulement connaître la composition globale du mélange acides gras restants et glycérides, on utilise le processus suivant : évaporation rapide de l'hexane, addition de quelques ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 1,6 p. 100 (v/v) afin d'estérifier les acides gras libres, addition de quelques ml d'hexane afin d'extraire simultanément les esters méthyliques provenant des acides gras et les glycérides non modifiés, enfin, addition à cet extrait hexanique de quelques ml d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,35 p. 100 (p/p) afin d'estérifier les acides gras des glycérides. Une addition finale de quelques ml d'une solution de carbonate neutre de potassium à 5 p. 100 et d'hexane permet d'obtenir les esters méthyliques totaux.

β) Si on s'intéresse à l'extraction sélective des acides gras libres restants avec les glycérides dans la phase hexanique on additionne celle-ci de 50 ml d'un mélange (50/50) d'alcool et de solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10 ou d'un mélange (50/50) d'alcool et de solution aqueuse de carbonate neutre de potassium à 5 p. 100 avec, pour objectif, la neutralisation des acides gras libres restants. La solution hydroalcoolique est ensuite acidifiée par l'acide sulfurique

dilué. Les acides gras libres sont recueillis dans l'hexane. Celui-ci est évaporé, le résidu est pesé. (On peut aussi utiliser l'addition d'étalon interne à la solution hydroalcoolique et on supprime alors la pesée). L'addition de quelques ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique 3 p. 100 (p/v) ou 1,6 p. 100 (v/v) permet la transformation en esters méthyliques des acides gras libres. Après l'addition habituelle de quelques ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5 p. 100 et d'hexane, les esters méthyliques sont recueillis. La phase hexanique contient alors les glycérides seuls. L'hexane est évaporé. Le résidu est pesé et les esters méthyliques des acides gras des glycérides sont préparés par transestérification à l'aide d'une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,35 p. 100 (p/v).

II. — Deuxième cas : présence d'acides gras volatils

1) Solution hydroalcoolique

A la solution hydroalcoolique obtenue par l'une quelconque des modalités d'extraction (a, b, c ou d) on incorpore une quantité connue (20 à 30 mg par exemple) des acides suivants : acide valérique et acide heptadécanoïque (ou acide pélagonique, moins cher). Ces acides jouent le rôle d'étalons internes et leur utilisation permet un dosage pondéral des acides gras y compris des acides gras volatils*. La solution hydroalcoolique est alors divisée en deux parties : l'une sert à la préparation des esters méthyliques, l'autre à l'analyse directe des acides gras volatils. La préparation des esters méthyliques comporte les opérations suivantes : acidification par quelques ml d'une solution d'acide sulfurique au 1/3, extraction des acides gras par quelques ml d'hexane, estérification des acides gras dans la solution hexanique elle-même par quelques ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 1,6 p. 100 (v/v). Le dosage pondéral des acides à 8 et plus atomes de carbone est rendu possible par l'utilisation de l'étalon interne (acide pélagonique ou heptadécanoïque).

La seconde fraction de la solution hydroalcoolique est placée sur plaque chauffante après addition de quelques ml d'une solution alcoolique ou aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10.

Le mélange eau-alcool est évaporé. Le résidu sec de savons est utilisé dans les conditions décrites par Roos et *al.* (1963) ou par

* Le dosage direct des acides gras volatils par chromatographie en phase gazeuse (Cf. KUZDZAL-SAVOIE et KUZDZAL, 1967) nécessite l'établissement préliminaire des coefficients de réponse de l'appareillage pour chaque acide volatil et par rapport à l'acide valérique. De ces coefficients de réponse découlent des facteurs de correction utilisés lors des calculs. Pour un appareillage déterminé nous utilisons les facteurs de correction suivants : 2,5 (acide acétique), 1,4 (acides propionique et isobutyrique), 1,1 (acides butyrique et isovalérique), 1,0 (acides isocaproïque, caproïque, etc.).

Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal (1968 a). Cette analyse permet le dosage quantitatif des acides gras libres volatils à 6 et moins atomes de carbone.

2) *Solution hexanique*

a) Si l'on a utilisé les modalités (c) ou (d), la solution hexanique ne contient plus d'acides libres, a fortiori, plus d'acides libres volatils. Par contre les glycérides en solution dans l'hexane peuvent contenir, à l'état estérifié, des acides gras volatils. Après évaporation de l'hexane, les glycérides sont pesés et l'on procède alors, soit à une transestérification des glycérides en ampoule scellée selon les conditions décrites (Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal, 1967), suivie d'une analyse complète des esters méthyliques par chromatographie en phase gazeuse avec programmation de température, soit, après addition d'une quantité connue d'acide valérique, à une saponification des glycérides à l'aide de l'hydroxyde de baryum qui permet en suivant le mode opératoire décrit (Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal, 1968 b) d'obtenir un dosage quantitatif des acides gras volatils estérifiés. Dans ce dernier cas, les acides gras non volatils peuvent être dosés en procédant à une transestérification des glycérides par une solution méthanolique d'hydroxyde de potassium à 0,35 p. 100 (p/v), qui permet, en évitant l'évaporation complète du solvant contenant les esters, de doser quantitativement les acides à 8 et plus atomes de carbone (à condition toutefois d'avoir auparavant déterminé les taux d'acides gras volatils).

b) Si l'on a utilisé les modalités (a) ou (b) ou d'autres non définies ici qui permettent de supposer que des acides libres volatils peuvent encore être présents dans la phase hexanique :

a) Si on ne s'intéresse pas à l'extraction sélective des acides gras libres mais au dosage des acides totaux libres et estérifiés de la phase hexanique, en tenant compte que certains peuvent être volatils on peut procéder après addition d'une quantité connue d'acide valérique et d'acide heptadécanoïque ou pélargonique à une saponification globale au moyen d'hydroxyde de baryum dans les conditions indiquées par Kuzdzal-Savoie et Kuzdzal (1968 b) en soumettant cependant le mélange à une forte agitation continue. Quand la saponification est terminée, la solution hydroalcoolique contenant les savons de baryum est séparée de l'hexane et l'on procède comme il est indiqué dans la technique décrite. On aboutit ainsi au dosage pondéral des acides volatils. Les acides gras non volatils peuvent être dosés à partir des savons insolubles ou totaux de baryum. Une partie aliquote de ceux-ci est acidifiée par 10 ou 20 ml d'acide sulfurique au tiers. Les acides gras libérés sont extraits par quelques ml d'hexane et l'addition d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 1,6 p. 100 (v/v) permet l'estérification. Le dosage des acides gras comptant 8 et plus atomes de carbone est possible grâce à l'utilisation de l'étalon interne (acide heptadécanoïque ou pélargonique).

β) Si au contraire on désire connaître séparément la composition des acides gras libres restants dans la phase hexanique et celle des acides gras estérifiés des glycérides, il convient d'analyser successivement ces deux groupes d'acides.

— En vue du dosage des acides gras libres restants (volatils et non volatils) on ajoute à la phase hexanique 50 ml d'un mélange (50/50) d'alcool et d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10 ou 50 ml d'un mélange (50/50) d'alcool et de solution aqueuse de carbonate neutre de potassium à 5 p. 100, dans lequel on a incorporé une quantité connue d'acide valérique et d'acide heptadécanoïque ou pélargonique. Après forte agitation et décantation la solution alcaline hydroalcoolique est recueillie. L'extraction est répétée une seconde fois et la solution hydroalcoolique est réextraite avec un peu d'hexane pour corriger tout entraînement des glycérides.

L'eau et l'alcool de la solution hydroalcoolique sont alors évaporés. Les savons secs sont répartis en deux fractions. Une fraction sert à l'analyse directe des acides gras par chromatographie en phase gazeuse selon la technique indiquée (Kuzdzal-Savoie, Kuzdzal, 1968 a) ; l'autre fraction est acidifiée par quelques ml d'une solution aqueuse d'acide sulfurique au tiers ; les acides gras libérés sont extraits à l'hexane. Quelques ml d'une solution méthanolique d'acide sulfurique à 1,6 p. 100 (p/v) sont ajoutés et après un temps de chauffage suffisant et l'addition habituelle de quelques ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5 p. 100 et d'hexane, les esters méthyliques sont recueillis.

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse et les quantités respectives des divers acides gras peuvent être connues grâce à la présence de l'étalon interne.

— Le dosage des acides gras estérifiés (glycérides), parmi lesquels peuvent se trouver des acides gras volatils, présents dans la phase hexanique maintenant débarrassée de tous les acides gras libres qu'elle contenait, peut être effectué comme il a été décrit au paragraphe 2-a « si l'on a utilisé les modalités (c) et (d) », de cette même section « présence d'acides gras volatils » (II-2^{me} cas).

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATION A L'ETUDE DU COMPORTEMENT DE QUELQUES ACIDES GRAS LIBRES INCORPORES A LA GRAISSE DE BEURRE

Divers acides gras volatils ou non volatils ont été incorporés à de la graisse de beurre. On a procédé, sur le mélange dissous dans l'hexane à une extraction des acides gras libres selon quelques-unes des modalités indiquées dans la méthode générale décrite ci-dessus.

I. — Extraction par une solution hydroalcoolique (50/50)

a) *Acide oléique*

On connaît au départ la quantité d'acide oléique contenue dans la graisse de beurre et la quantité d'acide oléique ajoutée. En suivant la méthode décrite en section I : « absence d'acides gras volatils », on a déterminé la quantité d'acide oléique extrait par la solution hydroalcoolique et la quantité d'acide oléique libre restant dans la phase hexanique à côté des glycérides.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1. La technique est fidèle. Le bilan est satisfaisant. On constate que l'acide oléique libre est resté avec les glycérides dans la phase hexanique. La très faible proportion d'acides libres dosés dans la phase hydroalcoolique provient du beurre. On y retrouve en effet le schéma habituel de répartition des acides gras du beurre ; l'acide oléique ne représente que 22,5 p. 100 des acides gras totaux.

Ainsi un mélange alcool-eau (50/50) n'entraîne pas l'acide oléique libre dissous dans l'hexane.

b) *Acide propionique*

On suit le mode opératoire décrit en II : « présence d'acides gras volatils ». On extrait d'abord au moyen d'une solution hydroalcoolique (50/50) c'est-à-dire selon la modalité (a), puis on procède à une seconde extraction au moyen du mélange (50/50) alcool-solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10. On n'a pas, dans cet essai, étudié la composition de la phase hexanique.

Les résultats sont portés dans le tableau 1. La presque totalité de l'acide propionique passe dans la première solution hydroalcoolique. On relève cependant une perte voisine de 10 p. 100 de l'acide propionique ajouté. La récupération est quantitative sur la matière grasse.

II. — Extraction par le mélange (50/50) alcool-solution aqueuse de carbonate acide de sodium à 1 p. 100

Les résultats des essais portant sur les acides gras libres non volatils sont rassemblés dans le tableau 2.

a) *Acide stéarique*

Une certaine proportion de l'acide stéarique ajouté, voisine de 25 p. 100, est entraînée dans la phase hydroalcoolique bicarbonatée. L'acide stéarique y est accompagné par une petite proportion d'acides gras libres (1 p. 1000 du poids d'huile de beurre) dont le schéma de répartition est analogue à celui des acides gras du beurre.

TABLEAU 1. — Extraction des acides gras libres par un mélange éthanol-eau (50/50)

	Composition du mélange de départ (en g)			Répartition des composés (en g)				Taux de récupération (en p. 100)		
	Huile de beurre	Acide gras	Total	Phase hydroalcool.	Phase hydroalcool. + NaOH	Phase hexanique	Total	Totale	Matière grasse	Acide
— Essai acide oléique Quantités (en g)	2,006	0,203	2,209	0,004		2,200	2,204	99,8		
	2,014	0,204	2,218	0,003		2,046 (p)	—	—		
Taux d'acide oléique (en p. 100)	31,5	100,0	37,9	22,5		37,5				
Bilan acide oléique (en g)	0,632	0,203	0,835	0,001		0,825	0,826			98,9
	0,634	0,204	0,838	0,001		0,767 (p)	—			
— Essai acide propionique Quantités (en g)	2,004	0,176	2,180	0,147	0,008	2,007	2,162	99,2	100,2	88,1
	1,998	0,183	2,181	0,154	0,004	2,005	2,163	99,2	100,3	86,3

p = pertes reconnues

TABLEAU 2. — Extraction des acides gras libres non volatils par un mélange éthanol-solution aqueuse de carbonate acide de sodium 1 p. 100 (50/50)

	Composition du mélange de départ (en g)			Répartition des composés (en g)			Taux de récupération (en p. 100)		
	Huile de beurre	Acide gras	Total	Phase hydroalcool. + HNaCO ₃	Phase hexanique	Total	Totale	Matière grasse	Acide
— Essai acide stéarique									
Quantités	2,003	0,197	2,200	0,052	2,145	2,197	99,9		
(en g)	2,006	0,200	2,206	0,049	2,152	2,201	99,8		
Taux acide stéarique (en p. 100)	9,9	95,0		90,0	15,4				
Bilan acide stéarique (en g)	0,196 0,197	0,186 0,189	0,382 0,386	0,046 0,044	0,330 0,333	0,376 0,377			98,4 97,7
— Essai acide oléique									
Quantités	2,002	0,205	2,207	0,178	2,031	2,209	100,1		
(en g)	2,018	0,209	2,227	0,174	2,067	2,241	100,6		
Taux acide oléique (en p. 100)	27,3	100,0		85,0	30,0				
Bilan acide oléique (en g)	0,547 0,551	0,205 0,209	0,752 0,760	0,152 0,148	0,609 0,620	0,761 0,768			101,2 101,1
— Essai acide laurique									
Quantités	2,034	0,203	2,237	0,206	2,028	2,234	99,9	99,7	
(en g)	2,018	0,205	2,223	0,204	2,014	2,218	99,8	99,8	
Taux acide laurique (en p. 100)	2,4	100,0		100,0	2,4				
Bilan d'acide laurique (en g)	0,049 0,048	0,203 0,205	0,252 0,253	0,206 0,204	0,049 0,048	0,255 0,252			101,2 99,6

b) *Acide oléique*

Lorsqu'on utilise un mélange (50/50) alcool-solution aqueuse de carbonate acide de sodium à 1 p. 100 à la place d'une simple solution hydroalcoolique (50/50), on entraîne une proportion beaucoup plus élevée d'acide oléique. Cette proportion atteint 75 p. 100 de l'acide oléique libre incorporé à la graisse de beurre.

Le bilan est satisfaisant. Les résultats reproductibles. Cependant une proportion plus élevée que dans l'expérience précédente d'acides gras libres provenant du beurre (1 p. 100 du poids de beurre) accompagne l'acide oléique.

c) *Acide laurique*

De façon très nette la totalité de l'acide laurique est entraînée dans la phase hydroalcoolique bicarbonatée. Le bilan de l'acide laurique est tout à fait satisfaisant.

Dans les essais comportant l'addition d'acides volatils à de la matière grasse de beurre, on étudie seulement la composition des phases hydroalcooliques successives (mélange 50/50 alcool-solution aqueuse de carbonate acide de sodium à 1 p. 100 et mélange 50/50 alcool-solution aqueuse d'hydroxyde de sodium N/10 ou mélange 50/50 alcool-solution aqueuse de carbonate neutre de potassium à 5 p. 100) sans aborder l'étude de la composition de la phase hexanique. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

d) *Acide hexanoïque*

Le bilan est moins satisfaisant. La méthode appliquée devrait permettre d'éviter les pertes d'acides volatils. Or celles-ci atteignent près de 15 p. 100 de l'acide hexanoïque introduit. On peut cependant affirmer que la totalité de l'acide hexanoïque est entraînée par la phase hydroalcoolique bicarbonatée.

e) *Acide propionique*

Il en est de même pour l'acide propionique, bien qu'une faible proportion (2 p. 100 environ) « résiste » à la première extraction. On ignore l'origine d'une légère surcharge (1 p. 100 du poids de matière grasse) de l'extrait hexanoïque.

Conclusion

L'extraction des acides gras libres est un problème complexe. Les acides à très courte chaîne, tels que l'acide propionique, passent facilement et totalement d'une phase hexanique dans une phase hydroalcoolique. Les acides à courte et moyenne chaînes jusqu'à et y compris l'acide laurique sont entraînés par une solution hydroalcoolique bicarbonatée. Cette solution permet également d'entraîner une proportion importante d'acide oléique présent, alors que l'acide stéarique « résiste » à cet entraînement.

TABLEAU 3. — Extraction des acides gras libres volatils par un mélange éthanol-solution aqueuse de carbonate acide de sodium 1 p. 100 (50/50)

	Composition du mélange de départ (en g)			Répartition des composés (en g)				Taux de récupération (en p. 100)		
	Huile de beurre	Acide gras	Total	Phase hydroalcool. + HNaCO ₃	Phase hydroalcool. + NaOH	Phase hexanique	Total	Totale	Matière grasse	Acide
— Essai acide propionique Quantités (en g)	1,996	0,198	2,194	0,200	0,005	2,020	2,225	101,4	101,2	103,5
	2,057	0,215	2,272	0,196	0,008	2,077	2,281	100,4	101,0	94,9
— Essai acide hexanoïque Quantités (en g)	2,017	0,210	2,227	0,167	0,001	2,014	2,182	97,8	99,9	80,0
	2,028	0,211	2,239	0,172	0,002	2,031	2,205	98,5	100,2	82,5

Le pH de la solution d'extraction, le pK des acides gras, déterminent la répartition des acides gras libres entre une solution polaire (hydroalcoolique) et une solution apolaire (hexanique).

Il apparaît donc possible, en utilisant la méthode générale décrite, d'extraire préférentiellement certains acides gras libres. Ceci devrait faciliter l'étude des acides gras libres des fromages par exemple et permettre en particulier une plus facile identification des acides gras libres mineurs.

Résumé

Dosage des acides gras libres

L'originalité de la méthode réside d'une part dans l'utilisation d'une technique d'extraction sélective qui permet de concentrer des acides libres d'une nature spécifique et d'autres part dans l'obtention de résultats pondéraux s'étendant aux acides volatils, que ceux-ci soient libres ou estérifiés.

A titre d'exemple la technique proposée est utilisée à l'étude du comportement de quelques acides gras libres incorporés à de la graisse de beurre.

Summary

Determination of free fatty acids

The method proposed is original in that a technique of selective extraction is used which allows free acids of a specific nature to be concentrated, and, on the other hand, weight relationships may be calculated which may be extended to the volatile acids, whether these are free or esterified.

As an example, the technique proposed has been employed for the study of the behaviour of some free fatty acids added to the fat fraction of butter.

Références bibliographiques

- KUZDZAL-SAVOIE (S.) et KUZDZAL (W.) (1968). — Utilisation des sels de baryum en vue du dosage des acides gras volatils du beurre. *Le Lait*, n° 475-476, 255-260. 1968 a : p. 256, paragraphes B et C. 1968 b : p. 256, paragraphes A, B et C.
- KUZDZAL-SAVOIE (S.) et KUZDZAL (W.) (1967). — Le dosage des acides gras volatils du beurre par chromatographie en phase gazeuse. *Le lait*, n° 468, 487-494.
- ROOS (J. B.), VERSNEL (A.) und WERDMULLER (G. A.) (1963). — Die gas chromatographische Bestimmung der niederen Fettsäuren von MilCHFett und deren Anwendung zum Nachweis von Fremdfetten. *Kieler Milchwirts. Forschungs*, 15, 515-526.

Reçu pour publication en mai 1971.