DOSAGE DE L'ACIDE NITRO-5 FURYLACRYLIQUE DANS LES VINS BLANCS (*)

Suzanne LAFON-LAFOURCADE
Institut National de la Recherche Agronomique
Institut d'Œnologie de Bordeaux
351, Cours de la Libération, 33405 Talence (France)

INTRODUCTION.

L'action inhibitrice de l'acide nitro-5 furylacrylique (5-NFA) sur les levures et les bactéries a été mise en évidence par un chercheur tchèque (FARKAS, 1973).

Une étude ultérieure nous a permis de déterminer les seuils d'inhibition de cet antiseptique en fonction des conditions de milieu et de la nature des germes. Nous avons montré notamment que cette substance permettrait la stabilisation des vins doux à la dose de 10 mg par litre. (LAFON-LAFOURCADE, 1974).

L'acide nitro-5 furylacrylique, par ses propriétés antibactérienne et antilevure, pourrait devenir l'objet d'éventuelles applications technologiques ; il nous a paru important de procéder à la mise au point d'une méthode de dosage de cet antiseptique dans les vins blancs.

Rappelons que l'acide nitro-5 furylacrylique est une substance jaune, inodore et sans saveur, stable à la lumière et à la chaleur. Ses sels de sodium et de potassium sont très solubles dans l'eau, dans l'alcool et le méthanol, mais insolubles dans les solvants non miscibles à l'eau. Le 5-NFA ne distille pas et n'est pas entraînable par la vapeur d'eau.

I. — DOSAGE DE L'ACIDE NITRO-5 FURYLACRYLIQUE EN SOLUTION SIMPLE

Principe du dosage.

Le groupe NO_2 de l'acide nitro-5 furylacrylique permet la diazotation de l'acide sulfanilique ; la combinaison de l'acide sulfanilique diazoté avec

(*) Travail réalisé en collaboration avec le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux.

l'α-naphtylamine conduit à la formation d'un colorant amino-azoïque (réaction de GRIESS). L'intensité de la coloration rose qui se développe dans le milieu réactionnel est fonction de la concentration en 5-NFA dans des limites précises ; elle se prête à une détermination colorimétrique à 520 nm.

Matériel et réactifs.

— Un spectrophotomètre opérant dans le visible.

— Une solution d'acide nitro-5 furylacrylique à 1 g par litre.

— Une solution d'acide sulfanilique à 0,6 p. 100 dans HCl 2,4 N (1/5).

— Une solution d'α-naphtylamine à 0,6 p. 100 légèrement chlorhydrique (1 ml HCl concentré pour 100 H_2O).

— Une solution d'acétate de sodium à 25 p. 100.

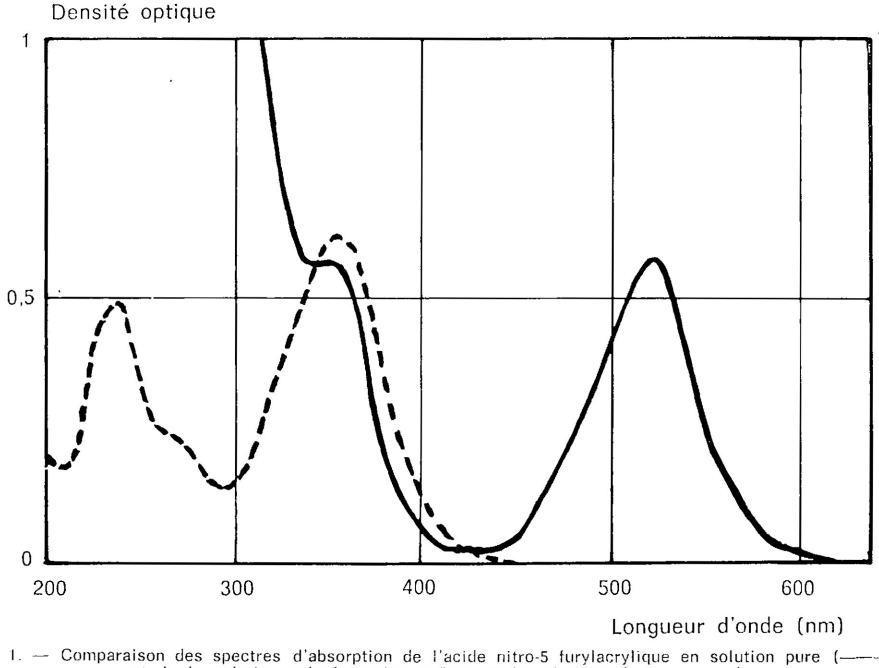


Fig. 1. — Comparaison des spectres d'absorption de l'acide nitro-5 furylacrylique en solution pure (————) et de la solution colorée amino-azoïque après réaction (— — — — —).
(Dans les deux cas les spectres correspondent à 20 µg d'acide nitro-5 furylacrylique en solution dans 4,2 ml de liquide).

Mode opératoire.

Sur une prise d'essai de la solution de 5-NFA on ajoute 2 ml de la solution d'acide sulfanilique.

En milieu fortement acide le groupe NO_2 du 5-NFA est libéré et l'acide sulfanilique diazoté. Cette diazotation s'opère lentement à la lumière ; sa durée est fonction de la concentration du milieu réactionnel en 5-NFA.

Lorsque la diazotation est terminée, on ajoute 1 ml de la solution de α-naphtylamine et 1 ml de la solution d'acétate de sodium. Il se forme une coloration rose, mesurable à 520 nm, après 5 à 10 mn, par rapport à un essai blanc contenant tous les réactifs sauf l'échantillon à doser.

On a réalisé les spectres d'absorption du 5-NFA en solution pure et du colorant amino-azoïque formé après réaction (figure 1).

La solution de 5-NFA possède un maximum d'absorption à 360 nm ; cette absorption n'interfère donc pas avec celle de la solution colorée amino-azoïque dont l'absorption maximale se situe à 520 nm, longueur d'onde à laquelle la densité de la solution pure de 5-NFA est nulle. Le choix de 520 nm comme longueur d'onde de dosage du 5-NFA est donc parfaitement valable.

TABLEAU I

Dosage du 5-NFA en solution simple : densités optiques relevées pour des concentrations connues en 5-NFA en fonction du temps de diazotation et du temps de développement du colorant amino-azoïque

Temps de diazotation (mn)		15		30		60		90	
Temps de développement de l'amino-azoïque (mn)		5	10	5	10	5	10	5	10
		Densités optiques		Densités optiques		Densités optiques		Densités optiques	
Concentration en 5-NFA (µg) dans la prise d'essai *	2,5	0,035	0,045	0,040	0,055	0,045	0,065	0,045	0,065
	5	0,065	0,085	0,080	0,110	0,090	0,130	0,090	0,130
	10	0,095	0,130	0,160	0,200	0,180	0,260	0,180	0,260
	15	0,155	0,200	0,200	0,250	0,260	0,390	0,270	0,390
	20	0,175	0,260	0,245	0,300	0,300	0,460	0,390	0,480

* Solution à 100 mg par litre

Le tableau I montre les densités optiques relevées pour des doses de 0 à 100 µg par ml de 5-NFA, dans les conditions précitées, en fonction du temps de diazotation et du temps de développement du colorant amino-azoïque.

Dans les conditions expérimentales indiquées, pour des quantités de 0 à 15 µg de 5-NFA contenues dans des volumes de solution de 0 à 0,15 ml, la diazotation est complète après 60 mn et les densités optiques sont proportionnelles aux doses de 5-NFA (fig. 2).

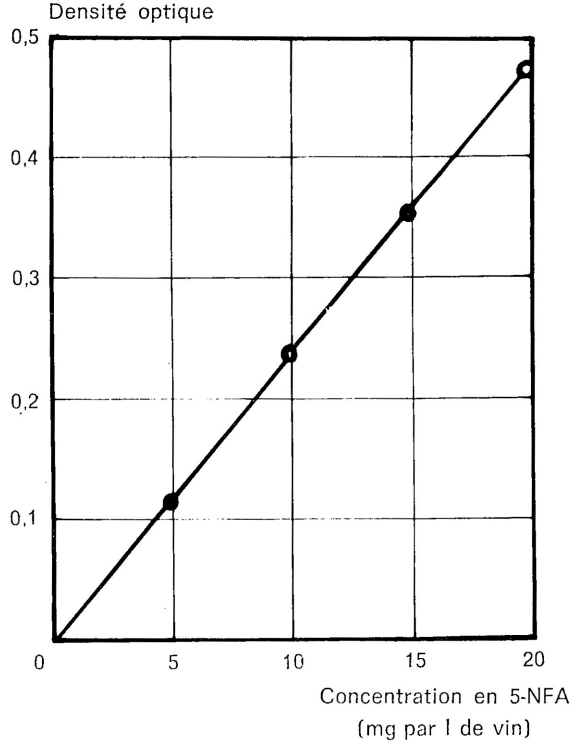


Fig. 2. — Dosage de l'acide nitro-5 furylacrylique en solution simple. — Courbe étalon.

II. — DOSAGE DU 5-NFA DANS LES VINS BLANCS.

Le 5-NFA est extrait du vin par démixtion. Cette technique a été étudiée dans les vins par DUBOIS (1969) et utilisée par BOIDRON et BERTRAND (1971) notamment, pour concentrer certaines substances des vins avant de les soumettre à l'analyse chromatographique.

Sur une faible partie de la phase organique dans lequel 5-NFA se trouve concentré on procède à la diazotation suivie de la formation du colorant amino-azoïque. On mesure l'intensité de coloration du milieu réactionnel à 520 nm.

Mode opératoire.

On procède selon une technique de supplémentation.

a) **Démixtion.**

Pour chaque dosage on prévoit 2 démixtions dans 2 fioles de 50 ml. Chaque fiole reçoit :

	1re fiole	2e fiole
Vin à doser	40 ml	40 ml
Solution de 5-NFA (1 g par litre)	0	0,2
eau	0,2	0
alcool à 95 °	2	2
$SO_4 (NH_4)_2$	20 g	20 g

Les deux fioles sont portées dans un bain-marie thermostaté à 26 °C placé au-dessus d'un bloc magnétique. Un barreau magnétique dans chaque fiole assure par une bonne agitation du milieu, l'homogénéité de la température et la dissolution aisée du sel ammoniacal.

Après une dizaine de minutes, le sel est dissous ; on laisse au repos dans le bain-marie ; la phase organique apparaît dans le col des fioles. La démixtion est complète après 30 mn environ. Avec une mince baguette de verre, on agite la phase organique avec précaution, ce qui a pour effet de rassembler dans l'interphase les voiles d'aspect colloïdal qui surnagent parfois.

Le volume de la phase organique varie en fonction de la composition du vin et notamment de sa teneur en alcool (de 1 à 3 ml environ).

b) **Diazotation et formation du colorant amino-azoïque.**

A un volume de 0,2 ml de la phase organique de l'une et l'autre fiole on ajoute 2 ml de la solution d'acide sulfanilique. La diazotation doit s'effectuer à la lumière. Le milieu réactionnel parfaitement incolore à l'origine brunit très légèrement en fonction du temps. Dans les conditions du dosage, la réaction est proportionnelle à la concentration en 5-NFA après 30 mn (tableau II).

On ajoute ensuite 1 ml de la solution d'α-naphtylamine et 1 ml de la solution d'acétate de sodium. Une coloration rose apparaît aussitôt qui

s'intensifie en fonction du temps. Elle est mesurable après une attente de 5 mn.

Le même traitement appliqué au même volume de la phase organique de la démixtion d'un vin dépourvu de 5-NFA ne provoque aucun développement de couleur dans le milieu réactionnel.

TABLEAU II

Dosage du 5-NFA dans la phase organique d'une même démixtion en fonction du temps de diazotation et du temps de développement du colorant amino-azoïque

Temps de diazotation (mn)	Temps de formation du colorant amino-azoïque (mn)	Densité optique de l'échantillon (Do_1)	Densité optique de l'éch. + supplément (Do_2)	Concentration en 5-NFA (mg par litre)	Erreur (p. 100)
15	10	0,055	0,055	0	
30	5	0,127	0,190	$\frac{5 \times 0,127}{0,063} = 10$	0
	10	0.142	0,212	$\frac{5 \times 0,142}{0,070} = 10,1$	1
45	5	0,187	0,280	$\frac{5 \times 0,187}{0,093} = 10,05$	0,5
	10	0,235	0,345	$\frac{5 \times 0,235}{0,110} = 10,5$	5
60	5	0,240	0,355	$\frac{5 \times 0,240}{0,115} = 10,4$	4
	10	0,310	0,460	$\frac{5 \times 0,310}{0,150} = 10$	0

On prévoit un essai à blanc : 0,2 ml de l'une ou l'autre des phases organiques est traité de la manière décrite précédemment mais reçoit 1 ml d'eau au lieu de 1 ml d'α-naphtylamine. Ce milieu reste très faiblement coloré en jaune pâle. Il sert à étalonner le spectrophotomètre.

Mesure et calculs.

Les densités optiques sont relevées, à 520 nm, par rapport à l'essai à blanc, dans le milieu réactionnel correspondant à l'échantillon, puis dans le milieu réactionnel correspondant à l'échantillon supplémenté. Si :

Do_1 est la densité optique correspondant à l'échantillon.

Do_2 est la densité optique correspondant à l'échantillon supplémenté.

$(Do_2 - Do_1)$ sera la densité optique correspondant à la supplémentation soit 5 mg par litre. (0,2 mg dans 40 ml de vin).

La concentration en 5-NFA est donnée par

$$C \text{ (mg par litre)} = \frac{5 \times Do_1}{(Do_2 - Do_1)}$$

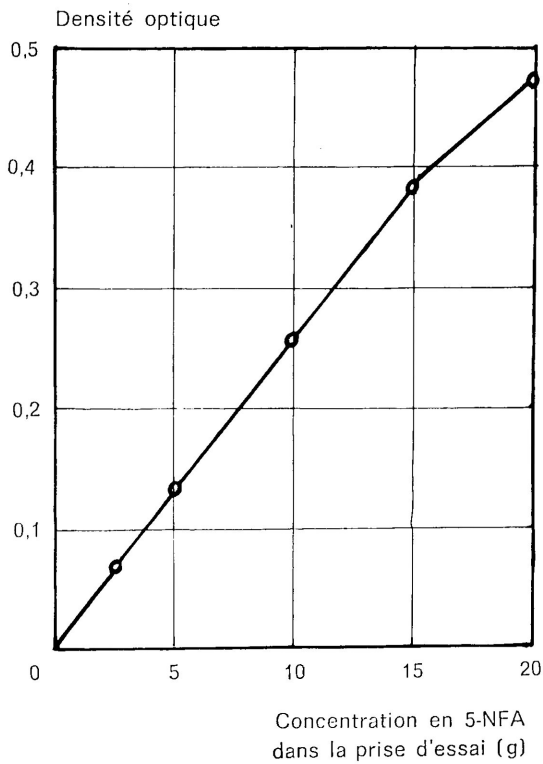


Fig. 3. — Dosage de l'acide nitro-5 furylacrylique en solution dans un vin blanc. — Courbe étalon.

III. — APPLICATION AUX VINS BLANCS.

1) La figure 3 montre pour un même vin ayant reçu des quantités croissantes de 5-NFA, de 0 à 20 mg par litre, les densités optiques relevées, après 1 h. de diazotation et 10 mn de développement du colorant, sur une prise d'essai de 0,2 ml de la phase organique de chaque démixtion.

TABLEAU III

Ecart type pour une série de dosages effectuée sur un même vin (7 démixtions ; 2 dosages sur chacune d'elles)

Echantillon	Rapport des densités optiques Do_1/Do_2	Concentration en 5-NFA (mg par litre)	Ecart à la moyenne (xi — x)	$(xi - x)^2$
1	0,230/0,350	9,5	— 0,7	0,49
2	0,284/0,424	10,1	— 0,1	0,01
3	0,235/0,345	10,05	— 0,15	0,02
4	0,310/0,460	10	— 0,2	0,04
5	0,220/0,320	11	+ 0,8	0,64
6	0,230/0,320	10,04	— 0,16	0,02
7	0,230/0,335	10,7	+ 0,5	0,25
8	0,230/0,340	10,04	— 0,16	0,02
9	0,240/0,366	9,5	— 07	0,49
10	0,230/0,335	10,7	+ 0,5	0,25
11	0,200/0,300	10	— 0,2	0,04
12	0,220/0,320	11	+ 0,8	0,64
13	0,220/0,325	10,4	+ 0,2	0,04
14	0,200/0,300	10	— 0,2	0,04

Moyenne » : 10,2

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma\,(xi - x)^2}{n - 1}}$$

$$n = 14$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{2,99}{13}} = \sqrt{0,23} = 0,48$$

Pour des concentrations en 5-NFA comprises entre 0 et 20 mg par litre les densités optiques sont proportionnelles aux doses de 5-NFA.

2) Le tableau II donne pour un même vin et une même démixtion les résultats obtenus en fonction des temps de diazotation et des temps de développement du colorant amino-azoïque.

TABLEAU IV

Concentrations en 5-NFA retrouvées par dosage dans des vins d'origine différente ayant reçu une addition de 10 mg de 5-NFA par litre

Echantillon	Do_1	Do_2	Concentration en 5-NFA (mg par litre)	Erreur (p. 100)
Pouilly	0,295	0,440	10	0
	0,285	0,430	10	0
Sauternes	0,275	0,425	9,1	— 9
	0,280	0,425	9,5	— 5
Graves	0,280	0,415	10,4	+ 4
	0,275	0,410	10,1	+ 1
Meursault	0,240	0,355	10,4	+ 4
Bordeaux blanc	0,180	0,265	10,5	+ 5
Cérons	0,200	0,300	10	0
Alsace	0,160	0,235	10,5	+ 5
Chablis	0,330	0,500	9,7	— 3
Bordeaux	0,172	0,260	9,7	— 3
Sauternes	0,215	0,330	9,3	— 7

erreur moyenne : 3,5 p. 100

Prise d'essai : 0,2 ml de la phase organique.
Temps de diazotation : 60 mn.
Temps de développement de l'amino-azoïque : 5 à 10 mn.
Pour le Chablis 10 mn à la lumière — 2 h. dans le noir.

Dans les conditions du dosage, la diazotation se poursuit au-delà de 60 mn, mais la détermination peut être effectuée après 30 mn avec précision.

Pour un même temps de diazotation, l'intensité de la coloration, c'est-à-dire la densité optique du milieu réactionnel croît en fonction du temps, à la lumière. Mais elle est mesurable avec la même précision après 5 ou 10 mn.

3) Le tableau III donne le calcul de l'écart-type sur une série de dosages effectuée sur un même vin (Meursault) ayant reçu 10 mg par litre

de 5-NFA. Il a été procédé à 7 démixtions et 2 dosages sur chacune des phases organiques (temps de diazotation 60 mn, temps de développement de l'amino-azoïque 10 mn environ). Un degré de confiance de 70 p. 100 peut être accordé à un dosage individuel à ± 0,48 mg près.

4) Le tableau IV donne les doses de 5-NFA retrouvées par dosage dans des vins d'origine différente qui ont reçu expérimentalement 10 mg par litre de 5-NFA.

Les additions de 5-NFA sont retrouvées à 3,5 p. 100 près en moyenne.

CONCLUSIONS

Une méthode est proposée pour le dosage de l'acide nitro-5 furylacrylique dans les vins blancs. A la condition de se placer dans les limites d'application décrites, notamment en ce qui concerne les concentrations en 5-NFA cette méthode s'avère :

— spécifique : elle donne zéro si elle est appliquée à des vins n'ayant pas reçu cet antiseptique,

— sensible : elle permet de détecter des doses de l'ordre de 2 mg par litre de 5-NFA,

— reproductible : l'écart type est de ± 0,48 mg,

— exacte : les additions aux vins sont retrouvées à 3,5 p. 100 près.

Cette technique nous paraît en outre relativement simple et ne nécessite qu'un appareillage modeste.

Nous remercions MM. P. SUDRAUD et J.-N. BOIDRON pour les conseils qu'ils nous ont donnés pendant la mise au point de cette technique de dosage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., 1971. **Chim. Anal.**, 53, **(9)**, 1-7.

BOIDRON J.-.N. Communication personnelle.

DUBOIS P., 1969. **Ann. Technol. agric.**, 18, **(3)**, 241-247.

FARKAS J., Smdenice 1973. Medzinarodna vinarska kouferencia.

LAFON-LAFOURCADE S., 1974. **Ann. Fals. Exp. Chim.**, 67, 275-282.