# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ACIDE CITRAMALIQUE DANS LES VINS

## II - DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE ET DE L'ACIDE CITRAMALIQUE *

G. DUBUS
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux

De moindre importance que celui des acides tartrique, malique, lactique et acétique, le dosage de l'acide citrique n'en a pas moins subi un certain développement au cours des dix dernières années.

L'acide citrique est dégradé partiellement lors des attaques bactériennes, et en particulier lors de la fermentation malolactique ; il peut donc être utile de connaître l'évolution de sa teneur au cours de la conservation du vin. En outre, cet acide fait partie des produits œnologiques dont l'addition au vin est légale en France, certaines législations étrangères ne l'autorisant pas ; en particulier, l'Allemagne n'autorise pas l'importation des vins traités par l'acide citrique.

Dans ce cas un peu particulier, la nécessité d'un dosage commode de cet acide s'impose donc, à la fois pour s'assurer, que la teneur en acide citrique, dans les vins destinés au marché français, ne dépasse pas la limite légale, et pour ne pas exporter dans certains pays un vin additionné d'acide citrique.

Il s'agit d'ailleurs d'un dosage plus complexe que les déterminations analytiques courantes ; il n'est effectué généralement que par des laboratoires spécialisés, tels que ceux de la Répression des Fraudes.

La principale difficulté est, tout d'abord, le manque de précision et de spécificité des méthodes utilisées ; grâce aux progrès accomplis par les techniques analytiques, les méthodes de dosage se sont affinées et la marge d'erreur a pu être considérablement diminuée.

* Cet article constitue la deuxième partie du condensé d'une thèse de doctorat de 3e cycle en chimie, mention biochimie, soutenue à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux, le 5 Février 1969.

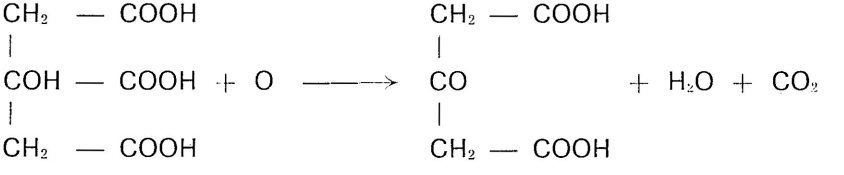
La principale cause d'erreur par excès dans les dosages classiques de l'acide citrique est due à la présence d'acide citramalique. Celui-ci présente de nombreuses réactions communes avec l'acide citrique ; on a donc cherché à mettre au point une méthode efficace de séparation, qui permette de doser les deux acides au moyen de la même réaction, l'acide citramalique présentant un intérêt théorique certain. Il existe, d'autre part, quelques réactions spécifiques de l'acide citrique, susceptibles d'être utilisées dans une méthode de dosage ; on n'en connaît actuellement aucune pour l'acide citramalique.

Nous étudierons, tout d'abord les diverses méthodes de dosage et les améliorations successives qui y ont été apportées ; nous comparerons leur précision respective, et nous essayerons de définir les divers courants de la recherche dans ce domaine.

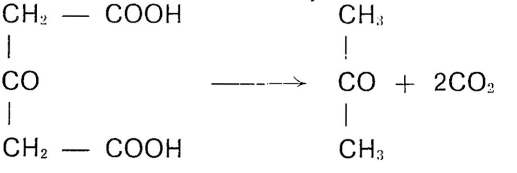
## I. - LE DOSAGE DE L'ACIDE CITRIQUE PAR LA METHODE KOGAN-PEYNAUD (1946)

Cette méthode est basée sur l'action fondamentale de l'oxydation de l'acide citrique en acide acétone-dicarbonique ; de nombreuses autres méthodes ont d'ailleurs repris le principe de cette réaction, en en modifiant le protocole.

L'agent oxydant utilisé par KOGAN est le permanganate de potassium en solution diluée, introduit goutte à goutte dans la solution citrique à l'ébullition. La réaction est la suivante :



Dans de telles conditions, l'acide acétone-dicarbonique se décarboxyle en acétone qui distille selon la réaction :



On dose alors l'acétone par iodométrie. KOGAN obtient ainsi un rendement en acétone de 85 p. 100 par rapport aux possibilités théoriques. La constance de ce rendement ne peut cependant être assurée que par une rigoureuse régularité des conditions opératoires, ce qui reste difficile.

A partir de cette technique, PEYNAUD (1946) parvient à atteindre le rendement théorique. Le mode opératoire suivi par cet auteur est le suivant :

L'acide citrique est d'abord précipité à l'état de citrate de baryum en milieu alcoolique à 50 °C de la manière suivante : Dans un tube de centrifugeuse, 25 ml de vin ou de moût sont neutralisés par une solution à 22 °B, en présence de phénolphtaléine ; on ajoute 10 ml d'une solution de chlorure de baryum à 100 g par litre, puis 30 ml d'alcool à 96°. On mélange et on abandonne au réfrigérateur pendant 2 à 3 heures. On centrifuge, on décante, on lave le dépôt à deux reprises avec 20 ml d'alcool à 50° saturé de citrate de baryum, en centrifugeant après chaque lavage. Le précipité est mis à égoutter, puis on l'entraîne par de l'eau chaude dans un ballon de Godet et Charrière. On acidifie par 5 ml d'acide sulfurique N environ et on ajoute 25 ml d'un tampon à pH 3,2-3,4 (150 g de phosphate acide de potassium + 5 ml d'acide phosphorique sirupeux pour 1 litre de solution). On ajoute 1 ml de solution de sulfate de manganèse à 50 g par litre, quelques grains de ponce et 100 ml d'eau distillée.

On chasse l'alcool par ébullition, en ramenant le volume du liquide à 100 ml environ. On place alors une solution N/20 de permanganate de potassium dans l'entonnoir à robinet du ballon d'oxydation, et on règle le débit de la solution oxydante à la cadence d'une goutte toutes les 2 secondes.

Ces conditions ont été précisées par GODET et CHARRIERE (1946).

On reçoit le distillat dans un ballon de 500 ml bouchant à l'émeri, contenant quelques ml d'eau, dans laquelle plonge le tube d'arrivée de vapeur. On poursuit l'opération jusqu'à coloration brune du liquide du ballon.

Le distillat contient à la fois de l'acétone provenant de l'acide citrique, et de l'éthanal provenant surtout de l'acide malique. Bien que l'auteur ne le mentionne pas, le distillat contiendrait également du formaldéhyde, décelable grâce à son odeur caractéristique, et qui pourrait avoir comme origine l'acide lactique du vin. On oxyde les aldéhydes à froid par le

permanganate de potassium, sans détruire l'acétone ; pour cela, les distillats sont amenés au même volume par addition d'eau distillée et à une concentration N/2 en acide sulfurique et N/10 en permanganate, au moyen d'acide sulfurique au tiers et de permanganate 2N. On bouche les flacons et on les laisse au repos pendant 45 mn à la température ambiante. On réduit alors l'excès de permanganate de potassium par addition d'une solution de sulfate ferreux à 400 g par litre. On distille et on recueille 50 ml de distillat dans un flacon bouchant à l'émeri contenant 5 $cm^3$ de soude 5N.

Dans le liquide ainsi alcalinisé, on ajoute 25 ml d'iode N/50, qu'on laisse en contact pendant 20 mn dans le flacon bouché. Puis on titre l'iode restant par le thiosulfate de sodium N/50, après avoir acidifié le milieu par 5 ml d'acide sulfurique au tiers, et en présence d'empois d'amidon. On effectue parallèlement un essai à blanc en faisant séjourner l'iode de la même façon pendant 20 mn, en milieu alcalin, pour établir la correspondance des solutions d'iode et de thiosulfate.

Finalement, un équivalent d'acide citrique correspond à 2 équivalents d'iode.

La teneur en acide citrique, exprimée en milliéquivalents par litre, est obtenue en multipliant par 0,4 le volume d'iode N/50 réduit ; lorsque l'oxydation porte sur les acides de 25 ml de vin ou de moût, on a :

$$\frac{v \times 40}{50 \times 2}$$ acide citrique en milliéquivalents par litre.

Avec des solutions simples d'acide citrique, les rendements en acétone sont, d'après l'auteur, retrouvés à 2 p. 100 près. Pour des vins, l'erreur relative ne dépasserait pas 3 à 4 p. 100.

En fait, l'erreur est beaucoup plus importante en présence d'acide citramalique ; en effet, cet acide, qui existe constamment dans le vin, s'oxyde lui aussi en acétone.

Etant donné que l'acide citramalique est synthétisé par les levures au cours de la fermentation alcoolique (DIMOTAKI-KOURAKOU, 1962), si on effectue au moyen de cette méthode le dosage de l'acide citrique sur le moût puis sur le vin, cet acide semblera avoir augmenté au cours de la fermentation de 30 à 40 p. 100. C'est ce que remarqua PEYNAUD (1946) ; ce fait a paru suffisamment singulier à cet auteur pour mériter une étude

approfondie. Par une expérimentation rigoureusement menée, il démontra cette « formation » d'acide citrique ; confiant dans la spécificité de sa méthode, il ne pouvait certes se douter qu'il venait de découvrir l'acide citramalique.

Une critique détaillée sera faite plus loin de la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU, qui, même pour le dosage de solutions pures d'acide citrique, n'est pas exempte de défauts.

## II. - METHODE DIMOTAKI-KOURAKOU (1962)

La méthode chimique de dosage est identique à la méthode KOGAN-PEYNAUD. L'innovation consiste en une séparation préalable des acides organiques sur des résines échangeuses d'anions, ce qui permet à DIMO-TAKI-KOURAKOU de doser simultanément l'acide citrique et l'acide citra-malique.

On fait passer 25 ml de vin à travers une colonne de Dowex 1 × 2 sous forme acétate, à raison de 3 ml toutes les 2 minutes. On rince la colonne avec 50 ml d'eau distillée à 3 reprises, et on élue avec 200 ml d'acide acétique 2,5 N, qui passe à travers la colonne à la même vitesse. Les premiers 25 ml d'éluant sont rejetés, le reste est recueilli dans un ballon d'oxydation de 500 ml. Dans cette première fraction se trouvent les acides succinique, lactique, galacturonique, citramalique, et la presque totalité de l'acide malique.

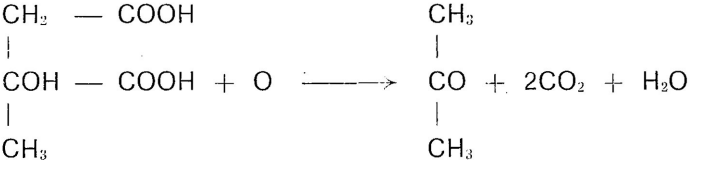
Les acides tartrique et citrique ne commencent à être élués qu'après le passage de 350 ml d'acide acétique. Pour accélérer l'élution de l'acide citrique, la colonne est lavée avec 100 ml de soude 2N, ce qui permet d'éluer également les acides tartrique et minéraux, ainsi qu'une partie des matières colorantes fixées par la résine. Dans chacune de ces deux fractions, seuls les acides citrique et citramalique peuvent être oxydés en acétone par le permanganate de potassium.

Dans le ballon contenant la première fraction de l'éluat, on ajoute 10 ml de soude 5N, 1 ml de sulfate de manganèse à 50 g par litre et quelques grains de pierre ponce. On porte à l'ébullition et on élimine les 75 premiers ml de distillat. L'oxydation est ensuite réalisée par du permanganate N/50.

A la seconde fraction, on ajoute 20 ml environ d'acide sulfurique dilué au cinquième, puis 25 ml de tampon à pH 3,2-3,4, 1 ml de sulfate de manganèse et quelques grains de pierre ponce. On élimine tout d'abord les

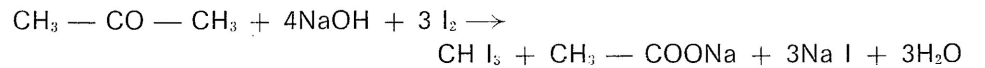
50 premiers ml de distillat, et on procède ensuite à l'oxydation avec du permanganate N/20. Pour les deux fractions, la suite du dosage est identique à la méthode KOGAN-PEYNAUD. L'oxydation est cependant menée à un rythme plus rapide (1 goutte de permanganate par seconde).

Tandis que l'acide citrique est oxydé en acide acétone-dicarbonique, se transformant ultérieurement en acétone. l'acide citramalique est directement oxydé en acétone selon la réaction :

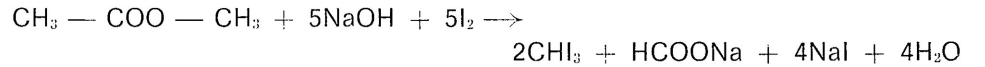


Après l'oxydation des aldéhydes, on distille l'acétone et on la reçoit dans 15 à 20 ml de soude 5N dans le cas de l'acide citramalique, et dans 5 ml de la même solution lorsqu'il s'agit d'acide citrique.

Dans les 2 flacons, on ajoute 25 ml d'iode N/50, qu'on laisse en contact 20 minutes ; il se forme de l'iodoforme. La réaction généralement admise est la suivante :



HAUGHTON (1937), a prétendu que cette interprétation conduit à des résultats entachés d'une erreur par excès de l'ordre de 25 p. 100 ; selon lui, la réaction se ferait selon le schéma suivant :



Au bout des 20 minutes, on ajoute 15 ml d'acide sulfurique dilué au cinquième dans le cas de l'acide citramalique, et 8 ml dans le cas de l'acide citrique. Puis on titre l'iode restant par le thiosulfate de sodium N/50. Comme dans la méthode KOGAN-PEYNAUD, on fait un essai à blanc.

Pour une prise d'échantillon de 25 ml de vin, et si n est le volume d'iode N/50 versé, les teneurs en acide citrique et en acide citramalique sont les suivantes :

— Acide citramalique : $n \times 0{,}01973$ g par litre

— Acide citrique : n × 0,0256 g par litre

Selon l'auteur, l'erreur moyenne serait de 3 p. 100 pour l'acide citramalique et de 8 p. 100 pour l'acide citrique.

Cette méthode, simple en apparence, est laborieuse dans sa réalisation pratique. De plus, sa spécificité n'est pas toujours satisfaisante.

Du fait de la faible capacité éluante de l'acide acétique, l'acide citrique doit être élué par la soude pour que l'opération s'effectue en un temps acceptable. Après le passage de la soude, on régénère l'échangeur avec de l'acide acétique 4N. Ceci provoque cependant de grandes variations du volume de la résine si bien qu'on est obligé de refaire la colonne à chaque dosage, pour permettre un écoulement correct du liquide.

La phase d'oxydation à chaud est la partie la plus délicate du dosage ; si l'arrivée du permanganate de potassium ne se produit pas suivant un rythme déterminé, et avec une régularité rigoureuse tout au long de l'oxydation, la reproductibilité de la méthode est fortement compromise (GODET et CHARRIERE, 1946). Il est très délicat d'assurer cette régularité d'une manière parfaite ; l'ébullition plus ou moins régulière (modifiée par le débit du permanganate froid) détermine des changements de pression à l'intérieur du ballon d'oxydation et ces changements modifient en retour la vitesse d'écoulement du permanganate. Il y a là une interaction complexe qui nécessite une rectification constante de la position des robinets d'écoulement du permanganate ; en effet, une position fixe de ces robinets ne permet pas d'assurer un débit régulier. Cela demande une attention continue, qui s'accorde difficilement avec la nécessité d'effectuer un grand nombre d'analyses en série.

Enfin, en appliquant cette méthode à des moûts non fermentés, CASTAING (1967) a constaté une consommation d'iode qui correspondrait à des quantités d'acide citramalique comprises entre 15 et 90 mg par litre. Ces valeurs ne peuvent être attribuées à l'acide citramalique ; CASTINO (1967) l'a prouvé sur un moût non fermenté ayant une teneur apparente en acide citramalique de 85 mg par litre. En soumettant à la chromatographie sur papier le liquide provenant de l'élution fractionnée, il n'a pas trouvé la tache caractéristique de l'acide citramalique.

Lors de la formation de l'iodoforme, le liquide devient opalescent, même pour une quantité d'iodoforme correspondant à 16 mg d'acide citramalique par litre. Or, une telle opalescence ne se produit pas dans les cas étudiés par CASTINO.

Après réduction de l'iode en excès par le thiosulfate, CASTINO extrait le liquide avec deux fois 5 ml de chloroforme ; l'extrait est lavé à l'eau, ajusté à 10 ml, et déshydraté au moyen de sulfate de sodium anhydre. Dans le spectre ultraviolet de la solution chloroformique, l'auteur ne retrouve pas les pics caractéristiques de l'iodoforme, à 274, 307 et 347 nm. Les mêmes pics sont présents de façon très nette dans l'extrait correspondant à un moût fermenté. Ceci prouve donc qu'il y a dans le moût une ou plusieurs substances qui consomment de l'iode et interfèrent dans le dosage.

D'ailleurs, toutes les restrictions relatives à la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU (exception faite de celles qui concernent la séparation sur échangeurs d'ions) sont également applicables à la méhode KOGAN-PEYNAUD.

## III. - DOSAGES SPECTROPHOTOMETRIQUES DE L'ACIDE CITRIQUE

### 1. Méthode de MARIER et BOULET.

On utilise la réaction spécifique de l'acide citrique avec la pyridine et l'anhydride acétique. Il se produit une coloration jaune. Cette méthode n'est citée que pour mémoire, car selon divers auteurs, elle n'est ni précise, ni fidèle.

### 2. Méthode de WEIL, MALHERBE et BONE.

On oxyde l'acide citrique par le métavanadate d'ammonium en présence de sels de brome. Il se forme de la pentabromacétone, qui réagit avec la pyridine en milieu alcalin en donnant une coloration rouge.

L'acide citramalique formant aussi de la pentabromacétone dans les mêmes conditions, sa présence est une cause d'erreur dans le dosage de l'acide citrique. Cependant, il n'est pas possible de doser ainsi l'acide citramalique après séparation préalable, car des solutions pures d'acide citramalique, dosées par cette méthode, ne donnent pas de résultats reproductibles (CASTINO, 1967).

En ce qui concerne l'acide citrique, le protocole opératoire, suivi par BUSHBECK (1965) est le suivant : dans un tube rodé, on mélange 5 ml d'acide sulfurique 27N et 10 ml d'échantillon, contenant entre 10 et 60 mg d'acide citrique.

On refroidit aussitôt le tube sous un filet d'eau. Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'une solution oxydante contenant du bromure de potassium, du bromate de potassium et du métavanadate d'ammonium. On ferme le tube avec un bouchon rodé, on agite et on place le tube pendant 20 minutes dans un bain-marie à 50 °C. A la fin de la réaction, pour éliminer l'excès de brome, on ajoute 2 ml d'une solution fraîche de sulfate ferreux et on agite vigoureusement ; on laisse le tube ouvert dans le bain-marie pendant 15 minutes environ, en agitant fréquemment. Au bout de ce temps, tout le brome a disparu.

A la solution colorée en vert par le sulfate ferreux en excès, on ajoute 5 ml d'heptane fraîchement distillé ; on bouche le tube, et on agite vigoureusement pendant au moins 2 minutes.

La pentabromacétone passe alors dans la phase heptane. Après séparation des deux couches, on aspire soigneusement la couche aqueuse inférieure avec une pipette. On fixe les dernières traces d'eau avec du sulfate de sodium anhydre.

On prélève avec une pipette 4 ml exactement d'heptane, et on les laisse dans une cuve de mesure, où on a déjà placé 2 ml de soude à 30 p. 100 et 3 ml de pyridine fraîchement distillée. On ferme la cuve, on l'agite fortement pendant au moins 30 secondes, puis on l'ouvre et on la place dans un bain-marie à 85 °C pendant 4 minutes. On la retire alors rapidement, on la bouche, on l'agite, on la place dans la glace fondante.

Après refroidissement complet, on agite de nouveau et on mesure l'absorption de la couche de pyridine colorée en rouge, par rapport à l'eau distillée. Les erreurs de mesure, d'après BUSHBECK (1965),sont de 1 à 5 p. 100, mais atteignent 95 p. 100 en présence de lipides. Exception faite des lipides, la cause d'erreur la plus importante dans cette méthode, semble due à l'acide citramalique.

3. **Méthode de REBELEIN (1967).**

On précipite l'acide citrique par les ions $Ba^{++}$ en milieu hydroalcoolique (65 à 66 p. 100 d'alcool) et alcalin. Après oxydation par l'acétate de plomb IV, il donne avec l'acide diazosulfanilique un composé coloré en jaune, dont on mesure la densité optique au spectrophotomètre à 420 nm.

On peut aussi séparer l'acide citrique sur un échangeur d'anions, qui, cependant, ne cède que 87 p. 100 de l'acide citrique initial, il faut donc en tenir compte dans les calculs. La méthode est spécifique de l'acide citrique ; dans les mêmes conditions, l'acide citramalique ne donne lieu à

aucune réaction. On élimine l'action des anthocyanes du vin sur la coloration finale par addition d'un peu de charbon décolorant.

La méthode de séparation de l'acide citrique sous forme de citrate de baryum est directement inspirée de la méthode KOGAN-PEYNAUD. On introduit dans un tube de centrifugeuse 5 ml de vin ou de moût avec 1 ml d'ammoniaque concentrée et 1 ml de chlorure de baryum à 20 p. 100. puis on mélange avec un agitateur. Au bout de 2 minutes, on ajoute 15 ml d'alcool à 96°, on mélange à nouveau puis on centrifuge pendant 4 minutes. On rejette le surnageant et on lave avec 2 ml de liquide de lavage (140 ml d'eau + 300 ml d'alcool à 96°). On mélange avec un agitateur coiffé d'un caoutchouc lisse. On rince l'agitateur avec deux fois 2 ml de liquide et on centrifuge de nouveau. On rejette le surnageant et on renouvelle l'opération de lavage. Le précipité encore humide est recouvert d'une solution de sulfate de sodium à 7,1 p. 100. On suspend le tube dans un bain-marie bouillant pendant 10 minutes, tout en désagrégeant le précipité avec l'agitateur.

Le contenu du tube est alors transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 50 ml, au moyen de la solution de sulfate de sodium à 7,1 p. 100.

On laisse refroidir et on complète au trait de jauge avec la même solution ; on mélange et on verse le tout dans un erlemneyer contenant 0,2 g de charbon actif. Au bout de 5 minutes, on filtre sur papier filtre serré. On prend deux petits erlemneyers marqués A et B, contenant chacun 10 ml de solution d'acétate de sodium à 27 p. 100, et on ajoute dans chaque fiole 2 ml de filtrat. On prépare alors une solution de diazotation contenant 5 ml de réactif de GRIESS I (1,5 g d'acide sulfanilique + 50 ml d'acide acétique cristallisable + eau distillée q.s.p. 250 ml) et 1 ml de solution de nitrite de sodium à 2 p. 100.

En agitant, on verse dans la fiole A 2 ml de cette solution puis 5 ml d'acide acétique cristallisable, et dans la fiole B, 2 ml de la solution de diazotation et 5 ml de solution à 1 p. 100 de tétracétate de plomb dans l'acide acétique cristallisable.

On règle aussitôt une minuterie sur 13 minutes. Au bout de 5 minutes, on filtre le contenu des fioles A et B sur des filtres à filtration rapide. Au bout de 11-12 minutes, on verse les filtrats dans deux cuvettes de 30 mm d'épaisseur, et on les dispose dans le photomètre. Dès que les 13 minutes sont passées, on mesure la densité optique du liquide de la fiole B à 420 nm ; le contenu de la fiole A sert d'essai à blanc. La teneur du vin ou

du moût en acide citrique est calculée en se référant à une courbe-étalon préalablement établie.

## IV. - DOSAGE ENZYMATIQUE DE L'ACIDE CITRIQUE

Cette méthode directe, rapide et rigoureusement spécifique, est certainement la meilleure pour le dosage de l'acide citrique.

Il existe deux méthodes pour doser les composés formés au cours d'une réaction enzymatique. Dans les méthodes directes, on mesure l'augmentation du composé final ou la diminution du composé initial de la réaction, lorsque l'un de ces deux composés possède un spectre d'absorption bien caractéristique, ou une propriété spécifique ; dans de telles réactions, on utilise beaucoup les déshydrogénases à $NAD^+$ et $NADP^+$ ; le transfert d'hydrogène fait apparaître un pic à 340 nm dans la courbe d'absorption du $NAD^+$ ; l'augmentation de densité optique pour cette longueur d'onde étant proportionnelle à la masse de composé initial disparu, on peut donc suivre directement la réaction au spectrophotomètre.

Il est des cas où on ne peut suivre directement aucun des éléments de la réaction, qui ne met pas en jeu une déshydrogénase à $NAD^+$ ou $NADP^+$. Heureusement, l'utilisation de telles déshydrogénases n'est pas limitée à leurs substrats.

La substance A à déterminer est d'abord transformée en une substance B par une première réaction, dite réaction auxiliaire. Le composé B sert alors de substrat à une déshydrogénase à $NAD^+$ (réaction principale), et on retombe dans le cas exposé au paragraphe précédent. La seconde réaction permet de déterminer la quantité initiale du composé A, si la première réaction est quantitative ; cette méthode est appelée méthode des réactions couplées.

Dans le dosage de l'acide citrique, la dégradation enzymatique de l'acide citrique est couplée à une réaction de déshydrogénation. Le NADH mis en jeu présente, comme nous l'avons vu, une forte absorption à 340 mμ ; la chute du taux de NADH étant indirectement proportionnelle à la quantité d'acide citrique présente initialement, il suffira de mesurer au spectrophotomètre la diminution de la densité optique à cette longueur d'onde pour connaître le taux d'acide citrique dans l'échantillon à doser.

$$\text{(I)}\quad \text{Acide citrique} \xrightarrow{\text{citrate-lyase}} \text{acide oxalacétique} + \text{acide acétique.}$$

$$\text{(II)}\quad \text{Acide oxalacétique} \xrightarrow[+\ \text{NADH}]{\text{malate-déshydrogénase}} \text{acide malique.}$$

Le citrate-lyase dégrade spécifiquement l'acide citrique à pH 7,6, en présence d'ions $Zn^{++}$. Le mode opératoire est le suivant (MAYER et PAUSE, 1965).

Dans une cuve en quartz de 3 ml et de 10 mm d'épaisseur, on mélange, à la température ambiante, la solution à doser (0,02 à 0,2 ml), 2,5 ml de tampon à pH 7,6 (contenant 4,5 g de triéthanolamine-HCl dissous dans 200 ml d'eau avec 4,5 ml de soude 2N, et complété à 250 ml), la solution de NADH à 1 p. 100 (0,01 ml) et 0,01 ml de solution de chlorure de zinc (40 mg de chlorure de zinc dissous dans 10 ml d'eau et 0,1 ml d'acide chlorhydrique 2N). On détermine la densité optique $E_1$ à 340 nm. Puis on ajoute 0,01 ml de lactate déshydrogénase et 0,01 ml de malate déshydrogénase ; au bout de 3 minutes, on lit $E_2$, qui doit être pratiquement égal à $E_1$. Si l'échantillon de citrate-lyase utilisé contient de l'oxalacétate-décarboxylase, il se forme du pyruvate à partir de l'oxalacétate. Par conséquent, pour éviter une erreur par défaut, en même temps que la malate déshydrogénase, on introduit de la lactate-déshydrogénase qui transforme l'acide pyruvique en acide lactique en consommant du NADH. Enfin, on ajoute 0,01 ml de citrate-lyase à 1 p. 100 dans le tampon triéthanolamine contenant 4 mg de chlorure de zinc par ml. L'acide citrique réagit dans les 3 à 5 minutes, et on procède à la mesure finale $E_3$.

Il est nécessaire de faire un essai à blanc avec 0,2 ml d'eau distillée à la place de l'échantillon ; en effet, la réaction est très sensible aux impuretés éventuelles. Le résultat E relatif à l'acide citrique sera corrigé en fonction du résultat obtenu lors de l'essai à blanc.

Pour avoir une idée du processus de la réaction, on peut enregistrer avec un spectrophotomètre enregistreur la courbe de la densité optique en fonction du temps, pour des concentrations en citrate de 100 mg par litre.

Généralement, on a $\dfrac{\Delta E \times V}{e \times d \times v} = \mu$ mole/ml d'échantillon.

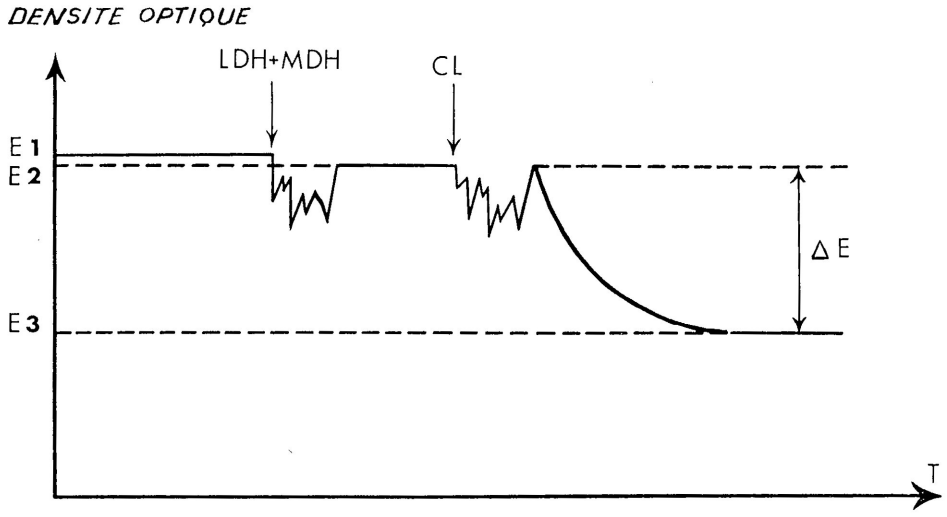



**Fig. 1.** — Dosage enzymatique de l'acide citrique.
Evolution de la densité optique en fonction du temps.
Les inscriptions LDH + MDH et CL représentent les moments correspondants aux additions d'enzymes.

E = coefficient d'extinction du NADH = 6,22 $cm^2/\mu$ mole pour $\lambda$ = 340 nm.

d = parcours optique de la cuvette (1 cm).

V = volume de l'essai (3 ml).

v = volume de l'échantillon.

PM de l'acide citrique = 192.

Δ E ayant été corrigé par rapport à l'essai à blanc, la teneur en mg d'acide citrique par ml d'échantillon est :

$$\frac{\Delta E \times 3 \times 192}{6{,}22 \times 10^3 \times v} = \Delta E \times \frac{0{,}092}{V}$$

Le domaine de précision du dosage se situe, selon les auteurs, entre 50 et 300 mg d'acide citrique par litre ; pour des concentrations plus élevées, il faut effectuer une dilution correspondante.

Nous avons effectué une étude détaillée de cette méthode de dosage et nous avons constaté que la précision du dosage est variable dans l'étendue du domaine de mesure ; il existe une concentration optimale, qu'il

faut s'efforcer d'atteindre en jouant sur le volume de l'échantillon, pour obtenir la précision maximum. On en jugera mieux en examinant les résultats donnés dans le tableau I, obtenus à partir de solutions pures d'acide citrique.

**TABLEAU I**

**Détermination de la concentration optimale en acide citrique (prise d'échantillon = 0,2 ml)**

| Acide citrique (mg par litre) | 50 | 100 | 200 | 200 |
|---|---|---|---|---|
| Valeur de la densité optique E2 | 0,372 | 0,410 | 0,392 | 0,439 |
| Valeur de la densité optique E3 | 0,255 | 0,175 | 0,028 | 0,066 |
| $\Delta E$ | 0,117 | 0,235 | 0,364 | 0,373 |
| Acide citrique trouvé (mg par litre) | 49,1 | 98,7 | 152,9 | 156,6 |

La densité optique de l'essai à blanc est négligeable (0,002)

On obtient des résultats corrects pour des concentrations variant de 50 à 100 mg par litre, pour 200 mg par litre, les résultats sont incorrects, mais constants (tableau II).

**TABLEAU II**

**Détermination de la concentration optimale en acide citrique (prise d'échantillon = 0,05 ml)**

| Acide citrique (mg par litre) | 50 | 100 | 100 | 200 |
|---|---|---|---|---|
| Valeur de la densité optique E2 | 0,456 | 0,484 | 0,419 | 0,395 |
| Valeur de la densité optique E3 | 0,432 | 0,430 | 0,348 | 0,263 |
| $\Delta E$ | 0,024 | 0,054 | 0,071 | 0,132 |
| + blanc | 0,036 (2) | 0,066 (2) | 0,076 (1) | 0,137 (1) |
| Acide citrique trouvé (mg par litre) | 57,6 | 015,6 | 121,6 | 219,2 |

(1) Densité optique de l'essai à blanc : 0,005
(2) Densité optique de l'essai à blanc : 0,012

Les résultats sont toujours valables pour une concentration de 100 mg par litre, mais ils sont incorrects cette fois pour 50 mg par litre.

La seule méthode permettant de limiter les erreurs au maximum sera donc d'effectuer simultanément, pour chaque échantillon, un dosage avec une prise d'échantillon de 0,2 ml et un autre avec 0,05 ml. La moyenne des deux mesures permet de situer l'échantillon parmi 3 classes arbitrairement choisies du domaine de mesure.

A chacune de ces divisions correspond le volume de prise d'échantillon donnant l'erreur minimum.

**TABLEAU III**

**Détermination du volume de la prise d'essai en fonction de la concentration en acide citrique**

| Concentration en acide citrique (mg par litre) | Volume de la prise d'échantillon (ml) |
|---|---|
| 0 à 100 | 0,2 |
| 100 à 200 | 0,05 |
| 200 à 300 | 0,02 |

Lorsque la concentration en acide citrique dépasse 300 mg par litre, on dilue le vin au demi, et on procède comme ci-dessus.

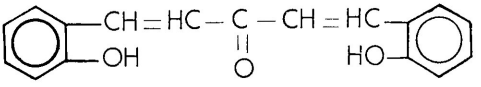
Si on désire obtenir toute la précision désirable, on peut alors recommencer le dosage en plusieurs exemplaires, avec la prise d'échantillon correspondante, et effectuer ensuite une moyenne des mesures. Dans ce cas, l'erreur relative ne dépasse pas 1 à 2 p. 100.

Il ne nous a pas été possible de continuer à contrôler cette excellente méthode par une série importante de dosages de l'acide citrique dans différents vins ; en effet, l'échantillon de citrate-lyase qui avait servi à l'étude précédente étant épuisé, nous n'avons pas pu nous procurer des échantillons commerciaux d'enzyme d'une activité comparable. Cet enzyme n'est commercialisé que depuis quelques années seulement, et il semblerait que sa préparation à grande échelle ne soit pas encore au point.

## V. - METHODE CASTINO (1967)

L'acide citramalique et l'acide citrique, préalablement séparés par un fractionnement sur une résine échangeuse d'anions, sont oxydés en acétone par le métavanadate d'ammonium en milieu fortement acide ; l'oxydation à chaud est très régulière, même si l'oxydant n'est pas ajouté goutte à goutte. Les aldéhydes pouvant perturber le dosage, sont, comme dans la méthode KOGAN-PEYNAUD et la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU, oxydés par le permanganate de potassium, à froid et en milieu acide.

L'acétone est ensuite dosée par une réaction colorimétrique spécifique, par condensation avec l'aldéhyde salicylique, en milieu basique et à chaud. Il se forme de la di-(vinyl-1, hydroxy-2 phényl) cétone dont la formule est la suivante :




L'aldéhyde salicylique et l'aldéhyde vanillique forment tous deux des produits de condensation avec l'acétone (BAHNER et SCHULZE, 1965). CASTINO accorde la préférence à l'aldéhyde salicylique, parce que l'aldéhyde vanillique, à concentration égale, ne produit pas une coloration aussi intense ; la réaction donnée par l'aldéhyde salicylique est quatre fois plus sensible que l'autre. L'intensité colorante du produit de condensation de l'aldéhyde salicylique et de l'acétone varie, de manière réversible, en fonction de la température ; l'équilibre correspondant à une température donnée n'est atteint qu'au bout d'un temps assez long. De plus, le produit de condensation est sensible à l'action de l'oxygène et de la lumière. C'est pourquoi, après la réaction de condensation, qui se fait dans des tubes bouchés à l'émeri, l'auteur laisse les tubes pendant une heure à l'obscurité et à la température ambiante, avant de faire la mesure de la densité optique de la solution au spectrophotomètre.

Le protocole suivi par CASTINO est le suivant : on prend 1,5 ml de vin, qu'on amène à 15 ml avec de l'eau distillée ; cette dilution a pour but d'augmenter le pH du vin, afin de ne pas provoquer dans la colonne d'échangeur un dégagement intempestif de gaz carbonique. On verse le liquide dans une burette de 50 ml, surmontant une colonne de 8 mm de diamètre interne, remplie de résine Dowex 1 × 8 (100-200 mesh) sous forme carbonate, sur une hauteur de 12 cm. On fait passer le vin dilué à la vitesse de 20 ml par minute (2 gouttes en 3 secondes). Après avoir rincé avec 20 ml d'eau distillée, on élue avec du carbonate d'ammonium

0,2 N ; on rejette les 50 premiers ml, et on recueille les 50 suivants, qu'on concentre au bain-marie à 100 °C jusqu'à 5-6 ml ; cette fraction contient l'acide citramalique. On élue ensuite l'acide citrique par 40 ml de carbonate d'ammonium N. Avec une colonne de petite taille, l'élution est relativement rapide ; de plus, le volume d'éluant est faible, car la capacité éluante du carbonate d'ammonium est relativement élevée.

Selon l'auteur, si l'on veut obtenir des résultats reproductibles, il faut veiller constamment à l'exactitude du titre des solutions éluantes. Cette vérification s'effectue facilement en dosant le carbonate d'ammonium par l'acide sulfurique titré, en présence d'hélianthine comme indicateur.

On régénère la colonne avec 50 ml de carbonate d'ammonium N, puis on la lave à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent. Il n'y a aucun problème de tassement de la résine au cours des différentes opérations. La colonne est montée une fois pour toutes, les seules manipulations étant le passage des liquides.

Les fractions concentrées sont placées dans des tubes de 50 ml bouchés à l'émeri ; on y ajoute les eaux de rinçage jusqu'à avoir environ 10 ml dans chaque tube. On ajoute alors 20 ml d'une solution de métavanadate d'ammonium 0,1 N dans l'acide sulfurique 6,75 N, on agite et on place les tubes pendant 30 minutes dans un bain-marie à 70 °C ; on refroidit ensuite les tubes et on ajoute 3,3 ml de permanganate de potassium N ; on agite, et on laisse au repos pendant 30 minutes.

On réduit ensuite l'excès d'oxydant par 4 ml de sulfate ferreux à 40 p. 100 dans l'acide sulfurique N. On verse alors le contenu de chaque tube dans un ballon à col rodé de 100 ml, et on ajoute les eaux de rinçage. On adapte au ballon une colonne Vigreux de 13 cm de hauteur, reliée à un réfrigérant descendant débouchant dans une fiole jaugée de 10 ml, plongée dans l'eau glacée. On distille pour recueillir un peu moins de 10 ml, on porte à la température ambiante et on complète au trait de jauge.

On prend exactement 5 ml du liquide, qu'on place dans un tube de 30 ml, bouché à l'émeri. On ajoute 4,0 ml de soude 1 ON et 2,0 ml d'une solution d'aldéhyde salicylique à 20 p. 100 dans l'éthanol exempt d'acétone. Cette solution doit être conservée à la glacière et avoir été préparée avec de l'aldéhyde salicylique fraîchement distillé.

On bouche les tubes et on homogénéise soigneusement le liquide. On maintient les tubes au bain-marie à 55 °C pendant 20 minutes. On les refroidit dans l'eau, et on les conserve pendant une heure à l'obscurité.

On fait alors la détermination de la densité optique à 530 nm, dans une cuve de 10 mm de parcours optique. On établit une courbe étalon à partir de solutions pures d'acide citramalique à 5, 10, 15, 20 et 25 mg par litre, en faisant le zéro avec un essai à blanc où on remplace la solution pure d'acide citramalique par de l'eau distillée.

Par cette méthode, selon CASTINO, on peut titrer l'acide citramalique avec une approximation de 6 mg par litre.

L'auteur s'est surtout intéressé à l'acide citramalique ; mais, comme nous l'avons vu plus haut ; il est possible, par un processus identique, de doser simultanément l'acide citrique. Il suffit pour cela d'établir la courbe étalon correspondante.

Nous avons étudié la technique de CASTINO et nos résultats ainsi que nos conclusions sont sensiblement différentes de celles de l'auteur.

L'inconvénient majeur de cette méthode est l'instabilité de l'aldéhyde salicylique. Ce corps, en effet, s'oxyde rapidement à l'air ; c'est pourquoi CASTINO recommande de préparer le réactif avec de l'aldéhyde fraîchement distillé. Nous avons donc distillé de l'aldéhyde salicylique sous vide à 90 °C, et obtenu ainsi un corps très légèrement teinté en jaune, conservé à + 4 °C. Malheureusement, la solution alcoolique de cet aldéhyde, rigoureusement exempte d'acétone et conservée elle aussi à la glacière donne des témoins dont la densité optique atteint 90 p. 100 de celle des échantillons à mesurer. CASTINO ne mentionne pas de telles difficultés. Nous avons alors essayé une méthode de purification chimique, par précipitation d'un complexe cuivrique, puis mise en liberté de l'aldéhyde ; cette technique ne permet pas non plus d'obtenir un réactif de pureté satisfaisante. La densité optique des différentes solutions-étalons ne présente qu'un très faible écart par rapport à celle du témoin, et la précision des mesures devient alors mauvaise.

CASTINO a peut être employé une méthode de purification de l'aldéhyde salicylique, non publiée. Ignorant ce procédé, et n'ayant pu découvrir une technique satisfaisante de purification nous avons dû renoncer à l'utilisation de ce réactif. Nous avons alors tenté de remplacer l'aldéhyde salicylique par l'aldéhyde vanillique.

L'aldéhyde vanillique compense la moins grande sensibilité de la réaction qu'elle donne avec l'acétone, par une remarquable stabilité vis-à-vis de l'oxydation. Nous avons donc entrepris de modifier la méthode de CASTINO, pour tenter d'en supprimer les imperfections.

Nous nous sommes référé au travail de VON BAHNER et SCHULZE (1965). Tout d'abord, l'aldéhyde vanillique, ou vanilline, ne doit pas être dissous dans l'éthanol ou le méthanol, car à la lumière et en présence d'oxygène, il se produit des réactions irréversibles qui, dans le dosage, donnent des témoins comparables à ceux de la méthode CASTINO. Il faut donc dissoudre l'aldéhyde dans l'eau distillée, où ce corps est peu soluble ; pour avoir des témoins d'une densité optique aussi faible que possible, la concentration globale en vanilline dans la solution de mesure doit être relativement faible ; ceci compense en partie l'inconvénient de la faible solubilité de la vanilline dans l'eau distillée (0,5 à 1 p. 100 à la température ambiante). La même solution de mesure doit être fortement basique, afin d'obtenir, dans l'étendue de la gamme de mesure une courbe plus rectiligne et de pente plus forte, ce qui facilite la lecture.

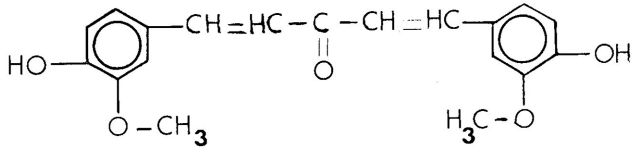
Les auteurs recommandent de maintenir l'échantillon pendant une heure à 37 °C, en présence de soude 5 N et de vanilline à 0,4 p. 100. On réalise le mélange suivant :

— 1 ml d'échantillon (acétone : 0 à 50 µg/ml) ;

— 5 ml de soude 10 N ;

— 4 ml d'une solution aqueuse à 1 p. 100 de vanilline.

Par le même processus de condensation que dans le cas de l'aldéhyde salicylique, il se forme de la di-(vinyl-1, hydroxy-4, méthoxy-3 phényl) cétone.




Avec 12,5 µg d'acétone, on obtient une densité optique de 0,140 ; celle du témoin est en moyenne de 0,014.

Avec les données de VON BAHNER et SCHULZE, et certaines de celles de CASTINO, il devrait être possible de mettre au point une

méthode de dosage précise et fidèle ; c'est ce que nous avons tenté de réaliser en apportant cependant de nombreuses modifications à leurs conclusions.

Il était nécessaire tout d'abord d'étudier avec précision la réaction colorée en fonction de la température, et du temps de réaction, et de déterminer la portion rectiligne de la courbe des densités optiques en fonction de la concentration en acétone.

La concentration de 0,4 p. 100 de vanilline dans la cuve de mesure est beaucoup trop élevée ; en présence de soude, cette solution est sursaturée, et il se produit très souvent des cristallisations intempestives de vanilline au moment de la mesure de la densité optique. Pour éviter cela, nous avons ramené cette concentration à 0,2 p. 100 ce qui est encore largement compatible avec la sensibilité exigée de la part d'un tel dosage. Notons que la solution aqueuse de vanilline à 1 p. 100 est saturée à 25 °C, et laisse déposer des cristaux au bout de plusieurs jours de conservation ; pour éviter cet inconvénient il suffit de porter cette solution à 50-60 °C pendant une dizaine de minutes juste avant de l'utiliser, puis de la ramener à la température ambiante ; la solution reste sursaturée pendant une quarantaine d'heures. Comme cette solution jaunit légèrement à la lumière,

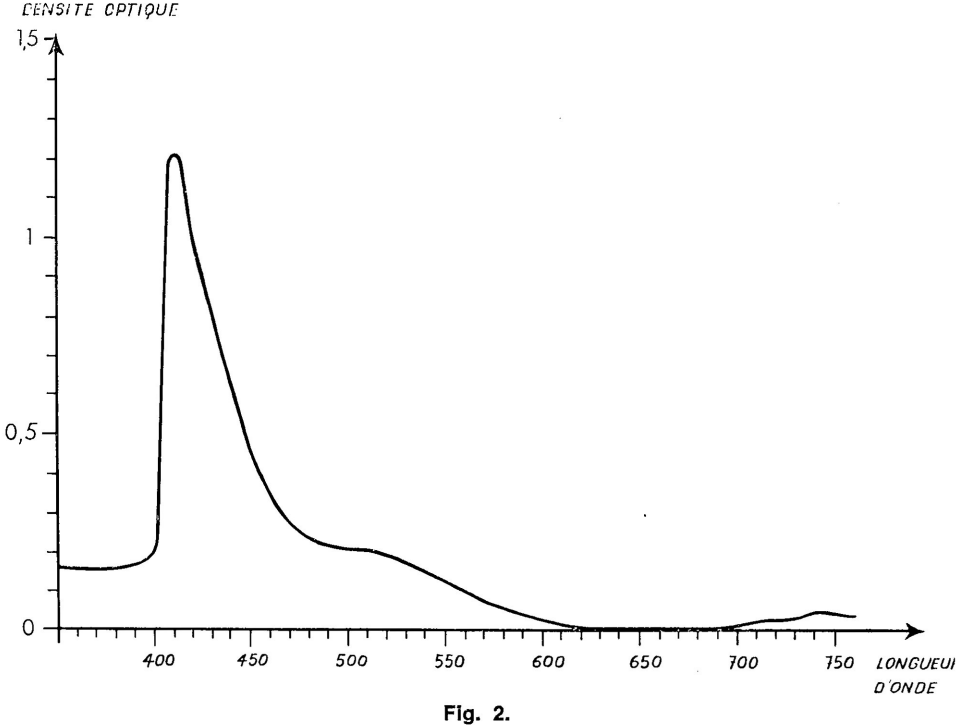



**Fig. 2.**

il est préférable de la conserver à l'obscurité et en petites quantités, afin de la renouveler souvent. Le réactif, de cette manière, donne toujours des résultats rigoureusement reproductibles.

Nous avons tout d'abord étudié le spectre d'absorption du produit de condensation. Il présente un très net maximum d'absorption à 410 nm ; c'est donc à cette longueur d'onde qu'il convient d'effectuer les mesures.

Nous avons ensuite réalisé une gamme de solutions pures d'acétone dans l'eau, que l'on fait réagir avec la vanilline en milieu basique à des températures et pour des durées variables.

On trace la courbe des densités optiques en fonction de la quantité d'acétone ; les résultats obtenus sont les suivants :

— Au bout de 30 minutes à 50 °C, la courbe étalon ne présente aucune partie rectiligne ;

— Au bout d'une heure à 50 °C, il existe une courte portion rectiligne ;

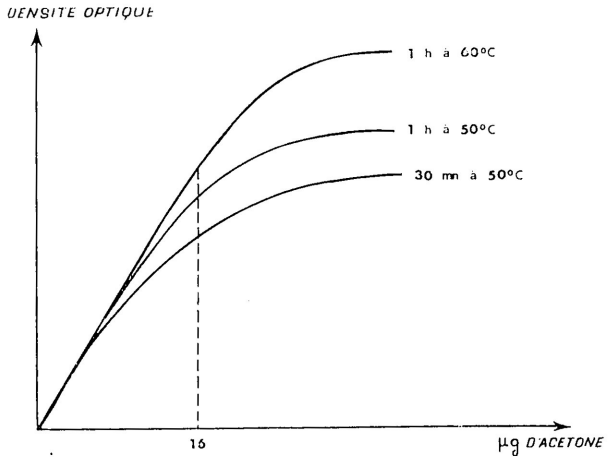



**Fig. 3.** — Influence des conditions de la réaction sur l'étendue du domaine de mesure.

— Au bout d'une heure à 60 °C, on se trouve en présence d'une partie rectiligne suffisamment longue.

La partie rectiligne de la courbe correspond à un domaine de mesure allant de 0 à 18 µg d'acétone. Pour obtenir des résultats valables, il faudra

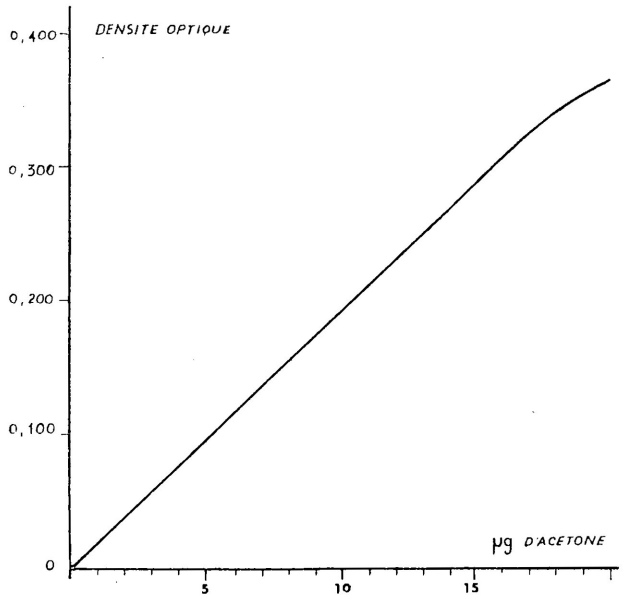



**Fig. 4.** — Courbe-étalon pour le dosage colorimétrique de l'acétone.

se maintenir toujours dans cette zone, en jouant sur le volume de l'échantillon contenant l'acide citramalique qu'on fait passer sur l'échangeur anionique.

Connaissant les conditions optimales de la réaction de condensation entre l'acétone et l'aldéhyde vanillique, il faut également bien connaître celles de la formation d'acétone, sur lesquelles CASTINO ne donne pas de précisions.

Nous n'avons pas modifié le mode opératoire de la phase d'oxydation de l'acide citramalique ou de l'acide citrique et de la purification puis de la distillation de l'acétone formée. On recueille celle-ci dans une fiole de 10 ml, on ajuste ultérieurement le volume au trait de jauge par de l'eau distillée, on prélève 3 ml du liquide, qu'on met dans un tube rodé, et on ajoute 5 ml de soude 10 N et 2 ml de solution aqueuse de vanilline à 1 p. 100, maintenue en sursaturation ainsi qu'il est indiqué plus haut. Le tube bouché est alors placé dans un bain-marie à 60 °C ; au bout d'une heure, exactement, on refroidit rapidement le tube dans de la glace pilée, et on détermine aussitôt la densité optique à 410 nm à la température ambiante, par rapport à un témoin. Ce témoin reçoit les réactifs énumérés précédemment, ainsi que 3 ml d'eau distillée, et subit le même traitement thermique que l'échantillon.

De même que le composé d'addition aldéhyde salicylique-acétone, le composé d'addition vanilline-acétone subit une lente altération sous l'action de l'air et de la lumière. Il y a deux moyens d'éviter cette altération :

— Soit en maintenant à l'obscurité les tubes soigneusement bouchés, jusqu'au moment d'effectuer la mesure de la densité optique ;

— Soit en ramenant le plus rapidement possible les solutions de mesure à la température ambiante, au sortir du bain-marie, et en les passant immédiatement au spectrophotomètre.

CASTINO, qui utilise l'aldéhyde salicylique, conseille d'attendre pendant une heure que l'intensité de la coloration obtenue s'équilibre, à la température où s'effectuent les mesures.

Avec l'utilisation de la vanilline, de tels problèmes ne se posent pas ; en effet, en opérant de la manière décrite, on obtient toujours des résultats reproductibles. Ceci tend à prouver que dans le cas du composé d'addition vanilline-acétone, il n'y a pas de variation de la densité optique en fonction de la température ou s'il s'en produit une, que l'équilibre est réalisé instantanément.

Si on travaille sur une gamme de solutions pures d'acide citramalique, dont on prélève 10 ml pour chaque terme qu'on traite suivant le processus ci-dessus, on trouve des résultats nettement inférieurs à ceux qu'on s'attendrait à trouver, connaissant la quantité d'acétone produite théoriquement par l'oxydation de l'acide citramalique mis en œuvre et la densité optique correspondant à cette quantité d'acétone.

Il se peut que le rendement de l'oxydation par le métavanadate d'ammonium n'atteigne pas 100 p. 100, et qu'il y ait en outre des pertes lors de la distillation de l'acétone.

La colonne de Vigreux de 13 cm nous donne l'assurance de retenir les produits peu volatils tels que l'eau, et, si on distille un volume suffisant, de recueillir en totalité les composés très volatils (acétone). Quel est ce volume optimum de distillat ? CASTINO recommande de ne distiller que 10 ml, soit environ 20 p. 100 du contenu du ballon de distillation.

Nous avons vérifié que, même en distillant 50 p. 100 de ce volume, la quantité d'acétone recueillie, pour un même taux initial d'acide citramalique, reste la même.

Il suffit donc de distiller un volume de 10 ml (dont on prélève par la suite 3 ml pour la réaction de condensation avec la vanilline). Encore faut-il être certain de condenser intégralement l'acétone qui distille. Le réfrigérant descendant, traversé par une eau à 15-18 °C est certes insuffisant. Mais nous pensons comme CASTINO, que le fait de placer la fiole réceptrice dans la glace fondante, surtout si le tube inférieur du réfrigérant plonge dans quelques gouttes d'eau, élimine tout risque de pertes d'acétone.

En calculant combien d'acétone devrait produire une quantité donnée d'acide citramalique, et en mesurant combien elle en produit en réalité, on peut déterminer facilement le rendement de l'oxydation. Il est de 11,7 p. 100 (chiffre établi sur un ensemble de mesures). De toutes façons, ce facteur correctif est éliminé par le fait que la courbe étalon est établie dans les conditions mêmes qui sont celles du dosage. C'est probablement pour cette raison que CASTINO ne donne pas de précisions à ce sujet.

L'acide citrique est oxydé par le métavanadate d'ammonium d'abord en acide acétone-dicarbonique, puis en acétone ; le rendement de cette oxydation est de 11,5 p. 100. Ce chiffre est très voisin de celui correspondant à l'acide citramalique ; en première approximation, on peut dire que le rendement de l'oxydation est le même pour l'acide citrique et l'acide citramalique et égal à 12 p. 100.

Il reste maintenant à étudier la séparation de l'acide citramalique et de l'acide citrique sur un échangeur anionique (AG 1 × 8, 200-400 mesh).

On utilise 20 ml de résine fixant 1,5 milliéquivalent par ml, soit 30 milliéquivalents, ce qui est amplement suffisant pour la quantité totale d'acide à fixer, puis à séparer. La résine est d'abord mise sous forme lavée avec 50 ml d'eau. On contrôle après lavage que l'effluent possède bien un pH voisin de la neutralité.

On fait passer sur la colonne échangeuse 10 ml d'une solution contenant de l'acide citramalique au rythme de deux gouttes en 3 secondes. On constate alors que, contrairement aux affirmations de CASTINO, 100 ml de carbonate d'ammonium 0,2 N n'éluent pas l'acide citramalique ; 100 ml de carbonate d'ammonium 0,5 N ne sont pas plus efficaces. Après passage de 100 ml de carbonate d'ammonium 0,2 N, on peut obtenir une élution partielle de l'acide citramalique avec 50 ml de carbonate d'ammonium N.

En faisant de nombreux essais d'élutions avec une gamme-étalon d'acide citramalique et une solution de carbonate d'ammonium N, nous

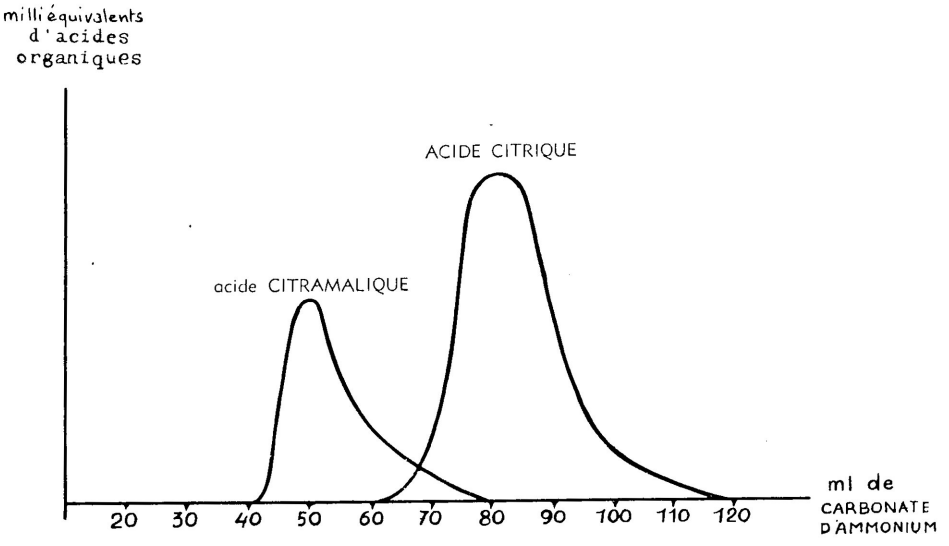
avons pu établir que les 40 premiers millilitres n'éluent pas d'acide citramalique ; il en passe 95 p. 100 dans les 30 ml suivants ; on peut obtenir une élution quantitative avec 10 ml d'éluant en plus.

Lors de l'isolement de l'acide citrique sur l'échangeur anionique, nous n'avons pas pu recueillir plus de 95 p. 100 de l'acide citrique mis en œuvre.

Les 60 premiers millilitres d'éluant ne contiennent pas d'acide citrique ; 90 p. 100 de cet acide passent dans les 40 ml suivants ; il faut encore faire passer 20 ml de carbonate d'ammonium N pour éluer les restes de ce qui peut être élué. Comme le montre la figure 5, l'acide citrique et l'acide citramalique sont très mal séparés ; cela n'est pas admissible pour un dosage dont la première exigence est la précision.

Il est donc difficile d'établir un dosage précis, tel qu'on pourrait l'obtenir avec la phase proprement chimique de cette méthode, sur une séparation initiale des éléments à doser sur une résine échangeuse d'ions. Même lorsque l'élution est quantitative, il est rare d'obtenir par ce procédé une séparation réellement efficace. Les méthodes analytiques mettant en jeu les échangeurs d'ions sont actuellement nombreuses ; si l'on suit scrupuleusement le mode opératoire mis au point par les divers auteurs, on obtient sans doute des résultats apparemment cohérents ; mais ces méthodes sont très peu reproductibles.

Une analyse détaillée de l'élution de ces échangeurs permet de s'en rendre compte. Lors d'une telle étude, on peut également constater des



divergences surprenantes dans le comportement séparateur d'une série de colonnes d'échangeurs, préparées cependant en même temps, avec une résine provenant d'un même lot, tassées d'une manière homogène, et traitées toujours de la même manière avec le même éluant. En particulier, le pic correspondant à un même acide n'apparaît pas forcément d'une colonne à l'autre, au bout du même nombre de millilitres d'éluant (tableau IV).

**TABLEAU IV**

**Dosage d'une solution pure d'acide citrique contenant 64 mg par litre sur cinq colonnes différentes**

| Volume d'éluant | Densité optique | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Col. 1 | Col. 2 | Col. 3 | Col. 4 | Col. 5 |
| 1 à 60 ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 61 à 80 ml | 0.035 | 0.093 | 0 | 0.100 | 0 |
| 81 à 100 ml | 0.099 | 0.020 | 0.057 | 0.003 | 0.125 |
| 101 à 120 ml | 0.008 | 0.008 | 0.076 | 0.008 | 0.011 |
| 121 à 140 ml | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

La seule explication de cette anomalie pourrait être une légère inégalité de tassement dans les différentes colonnes malgré tous les soins apportés à cette opération.

Avec le mode opératoire que nous avons mis au point, on disposerait donc d'une bonne méthode colorimétrique de dosage simultané de l'acide citrique et de l'acide citramalique, si on pouvait mettre au point une méthode réellement efficace de séparation de ces acides. Il reste donc encore beaucoup à faire dans ce domaine.

Cette méthode de dosage présente une erreur relative (calculée sur des solutions pures d'acides n'ayant pas passé sur les échangeurs) de 6 p. 100 pour l'acide citramalique et de 8 p. 100 pour l'acide citrique, donc sensiblement égale à celle de la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU, sans toutefois posséder les inconvénients de celle-ci.

## CONCLUSION

La méthode KOGAN-PEYNAUD est actuellement à peu près la seule qui soit couramment utilisée en France, dans les laboratoires d'analyse

des vins ; toutes les autres méthodes, à notre connaissance, appartiennent encore au domaine de la recherche ; il est préférable d'ailleurs, qu'elles restent des méthodes expérimentales, aussi longtemps qu'elles demeureront ce qu'elles sont actuellement, à une exception près.

La méthode KOGAN-PEYNAUD est donc fort répandue ; cependant on sait que l'acide citramalique subit les mêmes réactions d'oxydation que l'acide citrique, et que sa présence apporte une erreur par excès dans le dosage (DIMOTAKI-KOURAKOU, 1962) ; cela peut être grave, car dans les cas où la teneur en acide citramalique est importante, le taux d'acide citrique donné par cette méthode peut presque atteindre le double de sa valeur réelle.

Il faudrait, à notre avis, limiter l'emploi de cette méthode au dosage de l'acide citrique dans les moûts, où l'acide citramalique n'existe pas encore.

La méthode DIMOTAKI-KOURAKOU, présente les mêmes défauts que la méthode précédente, en ce qui concerne l'irrégularité de la phase d'oxydation ; c'est un détail que l'on peut à la rigueur négliger, si on ne recherche pas une précision extrême, dans le cas par exemple d'une série d'analyses de routine. Malheureusement, cette imprécision est encore augmentée par l'imperfection et l'irrégularité de la séparation de l'acide citrique et de l'acide citramalique sur les échangeurs d'ions.

La méthode CASTINO, fondée sur les mêmes principes, possède d'ingénieuses modifications, telles que l'utilisation du métavanadate d'ammonium et l'adoption d'une réaction colorée relativement simple. Malheureusement, elle est défectueuse par bien des détails, et ne donne pas de résultats supérieurs à ceux de la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU.

En ce qui concerne les autres méthodes colorimétriques, CASTINO a démontré que la présence d'acide citramalique apporte une erreur par excès dans le dosage de l'acide citrique par la méthode de WEIL, MALHERBE et BONE ; une séparation préalable des deux acides ne permettrait de doser que l'acide citrique par cette méthode, les résultats obtenus avec l'acide citramalique étant trop irréguliers (CASTINO, 1967).

Nous n'avons pas vérifié la méthode de REBELEIN. Elle semble au premier abord fort complexe et en général, la multiplication des manipulations au cours d'un dosage entraîne une augmentation du pourcentage d'erreur relative.

La seule méthode offrant toutes garanties pour le dosage de l'acide citrique est la méthode enzymatique de GRUBER et MOLLERING. Elle allie à une stricte sélectivité une excellente précision, et surtout une grande rapidité de mise en œuvre. Comme pour toutes les techniques faisant appel aux enzymes, elle nécessite beaucoup de soin et une très grande propreté du matériel utilisé. Les deux seules difficultés sont la nécessité d'ajuster la concentration en acide citrique à un optimum (afin d'obtenir toute la précision qu'offre cette technique), et l'obligation d'utiliser un enzyme suffisamment purifié ; ce dernier point n'est malheureusement pas toujours vérifié dans le cas des préparations commerciales actuelles. Mais on peut espérer que les techniques de préparation à grande échelle seront bientôt suffisamment au point pour fournir un produit dont l'activité ne sera plus sujette à de regrettables fluctuations.

On dispose donc actuellement d'une excellente méthode de dosage rapide de l'acide citrique, mais pour les diverses raisons que nous avons évoquées, outre le prix très élevé des réactifs nécessaires, cette technique n'est pas encore du domaine des analyses courantes.

Pour doser l'acide citramalique, on ne connaît jusqu'à présent que la méthode DIMOTAKI-KOURAKOU et la méthode CASTINO. Actuellement, seuls les besoins de la recherche peuvent nécessiter le dosage de cet acide. Or, l'imperfection des deux seules méthodes existantes étant difficilement compatible avec la précision exigée par des travaux expérimentaux, il faut reconnaître qu'il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode valable permettant de doser l'acide citramalique.

Les améliorations que nous avons apportées à la méthode CASTINO ne servent à rien tant qu'on ne disposera pas d'une méthode réellement efficace de séparation des acides citrique et citramalique. Nous avons vérifié que ces deux acides ne sont pas séparés par la précipitation « sélective » sans forme de sels de baryum, en milieu hydroalcoolique et alcalin. Le seul espoir de parvenir à un résultat satisfaisant réside donc dans une meilleure connaissance des résines échangeuses d'ions. Cela pourra être réalisé un jour, au prix d'études approfondies.

Une autre voie, bien plus fructueuse, serait d'utiliser une réaction enzymatique pour doser l'acide citramalique. Il serait possible, par exemple, d'utiliser une citramalase, qui, en présence d'ions $Mg^{++}$, transforme l'acide citramalique en acide acétique et en acide pyruvique.

Cet acide pyruvique, en une seconde réaction, pourrait être transformé en acide lactique, par la lactate-déshydrogénase, en présence de

NADH ; la diminution de densité optique à 340 nm permettrait ainsi de connaître le taux initial d'acide citramalique. Le seul inconvénient, c'est qu'à notre connaissance, cette précieuse citramalase n'a pas encore été isolée.

Au cours de recherches sur le métabolisme de l'acide citramalique, nous nous sommes trouvé dans la nécessité, sinon de doser, du moins d'évaluer quantitativement cet acide. Ne pouvant utiliser les méthodes dont nous venons de parler, nous avons choisi une technique chromatographique mise au point par CARLES et ALQUIER-BOUFFARD (1965). Des résultats quantitatifs ont été obtenus au moyen de cette méthode par TALIEU-ROUSSEAU (1967), ainsi que par LOUME (1967) qui y a apporté quelques modifications. Cette méthode, d'une grande souplesse, permet de séparer presque tous les acides organiques, à condition de l'adapter à chaque cas particulier. Nous avons donc modifié légèrement la méthode de CARLES et ALQUIER-BOUFFARD, en vue d'une meilleure séparation de l'acide citramalique ; par une étude approfondie, nous nous sommes efforcé de diminuer autant que possible l'imprécision inhérente de cette technique.

Bien entendu aucune technique chromatographique quantitative ne peut prétendre être précise. La mesure de la surface des pics ne pose guère de problèmes ; mais lorsque ces pics sont partiellement confondus, ce qui arrive souvent, la correction nécessaire ne peut se faire qu'à l'estime ce qui explique le manque de précision de telles mesures. Dans la méthode que nous avons utilisée, l'incertitude relative, peut atteindre 10 p. 100 compte tenu des facteurs de correction apportés.

Nous avons donc adopté cette technique, malgré son imperfection et surtout parce qu'il n'en existe pas de meilleure. Elle présente cependant certains avantages. Comme toute méthode de chromatographie sur colonne, elle permet de travailler sur un grand nombre de composés à la fois, et elle prend toute sa valeur lorsqu'il s'agit de connaître, sans l'exigence d'une grande précision, l'évolution simultanée de la teneur de plusieurs acides organiques, dans des phénomènes essentiellement dynamiques. C'est pourquoi elle est précieuse dans l'étude de la fermentation alcoolique.

C'est actuellement le seul moyen de connaître la teneur en acide citramalique d'un vin ; cette méthode n'est pas plus longue que la méthode CASTINO, elle est au moins aussi précise, sinon plus. Pour disposer d'une véritable technique de dosage de l'acide citramalique, il faudra donc continuer à améliorer la méthode CASTINO ou mettre au

point une méthode de dosage enzymatique. La première serait à notre avis préférable, car elle permettrait, en une seule opération, de connaître la teneur des deux acides.

## BIBLIOGRAPHIE


BUSHBECK R., Eine modifizierte Bestimmungsinethode für Citronensaüre, **Pharmazie Dtschl.,** 1965, **20,** 1, 27-28.

CARLES Y. et ALQUIER-BOUFFARD A., De quelques perfectionnements pour la chromatographie sur colonne des acides organiques, **Bull. Soc. Chim. Biol.,** 1965, **47,** 7, 1519-1521.

CASTINO M., Microdeterminozione colorimetrica dell'acido α-metilmalico mei vini, **Riv. Vit. Enol.,** 1967, **6,** 247-257.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., La présence de l'acide α-méthylmalique dans les vins, **Ann. Fraudes Exp. Chim.,** 1962, **55,** 149-148.

DUBUS G., Contribution à l'étude de l'acide citramalique dans les vins, Thèse 3e cycle, 1969, Bordeaux.

GODET C. et CHARRIERE R., Sur le dosage de l'acide citrique dans les vins, jus de fruits, concentrés, etc., **Mitt. Geb. Lebensen. Hyg.,** 1946, **37,** 317-326.

LOUME C., Etude chromatographique des acides polycarboxyliques produits par les levures du genre **Saccharomyces,** DES, Bordeaux, 1967.

MAYER K. et PAUSE G., Ein enzymatische citronensaürebestimmung, **Mitt. Geb. Lebensen. Hyg.,** 1965, **56,** 5, 454-458.

PEYNAUD E., Contribution à l'étude de la maturation du raisin et de la composition des vins, **Thèse docteur-ingénieur,** Bordeaux, 1946.

REBELEIN H., Dosage colorimétrique de l'acide citrique dans le vin et dans le moût, **Dtschl. Lebensen. Rundsch.,** 1967, 337-340.

TALIEU-ROUSSEAU M., Thèse doctorat, Toulouse, 1967.

TAPERNOUX A. et MAGAT, Dosage de l'acide citrique dans les laits desséchés et concentrés, **Ann. Nutr. Alim.,** 1960, **14,** 6, 81-86.

TARQUAUD O., La teneur des laits en acide citrique évaluée par une méthode colorimétrique, **Thèse doctorat Vét.,** Lyon, 1960.

VON BAHNER F. et SCHULZE G., Bestimmung des acetons mit vanillin und mit salicyaldehyd, 3-Klin. Chem., 1965, **1,** 10-14.