ETUDE DES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA DETERMINATION DES COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX PAR LE REACTIF DE FOLIN-CIOCALTEU

J. BLOUIN*, L. LLORCA *, F.R. MONTREAU**, et J.H. DUFOUR***
* Chambre d'Agriculture de la Gironde
** Université Paul Sabatier, Toulouse
*** Stagiaire de l'E.N.I.T.A. de Bordeaux

PRINCIPES DE LA METHODE

En milieu alcalin, les phénols réduisent le mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolybdique en oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Cette propriété est utilisée pour le dosage des composés phénoliques du vin en faisant appel au réactif de FOLIN DENIS ou de FOLIN CIOCALTEU. SINGLETON et ROSSI (1965) ont montré, puis SAPIS et RIBÉREAU-GAYON (1968) ont confirmé, la supériorité du second réactif (coloration plus forte, plus stable et absence de troubles). RIBÉREAU-GAYON (1970) et CANBAS (1971) ont précisé la spécificité, la reproductibilité et la précision de leur méthode appliquée aux vins. Plus récemment MONTREAU (1972) a poursuivi les travaux de SINGLETON et ROSSI sur l'influence de la température sur la réaction.

En comparant ces travaux qui diffèrent sur plusieurs points nous avons entrepris d'étudier l'ensemble des facteurs de variation de la réaction pour les optimiser : longueur d'onde de mesure, température de réaction, temps d'attente, concentration en réactif, alcalinité du milieu. L'objectif est de déterminer un mode opératoire stable et reproductible et permettant facilement un travail rapide en série.

Le schéma de la réaction est :

— on verse **1 ml** de vin (dilué en général)
— puis **a ml** de réactif de Folin-Ciocalteu
— **b ml** de Na_2CO_3 à 20 p. 100

On complète à un volume connu (100 ml en général). On attend **x minutes** à la température **t** et on colorimètre à la longueur d'onde λ.

LONGUEUR D'ONDE DE MESURE

SINGLETON et ROSSI ont montré que le maximum d'absorption se situe vers 750-770 nm. Par la suite, les autres auteurs cités mesurent à 700 nm pour des raisons non précisées.

En déterminant de très nombreux spectres d'absorption pour l'ensemble des conditions possibles de réaction, on observe un réseau de courbes très semblables. La figure 1 en donne quelques exemples extrêmes pris parmi plusieurs dizaines de cas, avec de l'acide gallique ou des vins. Dans tous les cas, le maximum d'absorption se situe entre 740 et 770 nm, le plus souvent vers **750 - 760 nm.** La courbe d'absorption est peu « pointue » mais la longueur d'onde de 700 nm est toujours éloignée du maximum d'absorption et doit donc être rejetée.

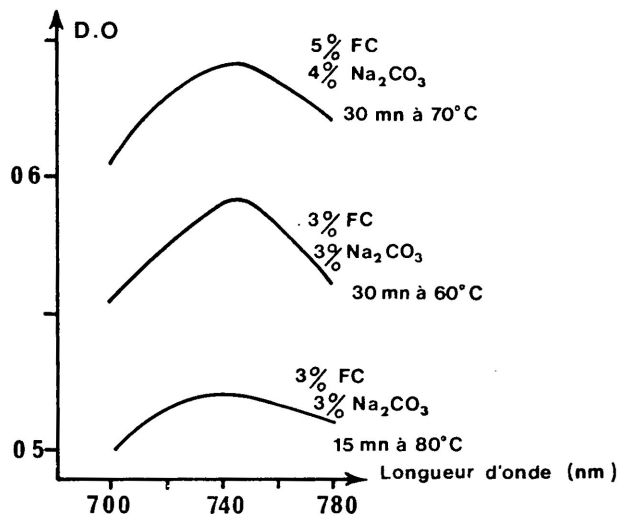


Fig. 1. — Spectres d'absorption de la réaction Folin-Ciocalteu / polyphénols

TEMPERATURE ET DUREE DE CHAUFFAGE

A la température ambiante, la réaction évolue lentement pendant plusieurs heures ou plusieurs jours. Les densités optiques obtenues sont donc variables avec le temps de réaction car on n'atteint pas le palier de la réaction. Par ailleurs, les densités optiques obtenues sont plus faibles qu'avec des réactions à température plus élevée. MONTREAU a montré les possibilités du **chauffage à 60 - 70 - 80° C pendant 10 à 30 minutes.** Au delà on observe des précipitations. La température optimale et la durée de chauffage varient avec les autres conditions de la réaction (cf. plus loin).

CONCENTRATION EN REACTIF DE FOLIN-CIOCALTEU et ALCALINITE DU MILIEU

Le réactif est très acide (10 p. 100 HCl et 5 p. 100 H_3PO_4 en particulier) et doit être neutralisé par Na_2CO_3. Nous avons utilisé de 1 à 10 p. 100 de réactif pour 10 à 25 p. 100 de Na_2CO_3 à 20 p. 100 (soit 2 à 5 p. 100 de Na_2CO_3 pur dans le milieu réactionnel) et des teneurs en tanin (exprimé en acide gallique) atteignant 20 mg par litre de milieu réactionnel.

Concentration en réactif Folin-Ciocalteu

La figure 2 donne quelques résultats observés pour 1, 2, 4, 5 et 10 p. 100 de réactif F.C. (20 p. 100 de Na_2CO_3 à 20 p. 100, 1 ml d'acide galllique à 500 mg par litre pour 100 ml, 70° C). Pour 1 et 2 p. 100 la réaction est très rapide puis rétrograde (le phénomène est encore plus net pour des concentrations supérieures en tanins). Au contraire pour 10 p. 100 de réactif de F.C., on observe une floculation rapide. Elle intervient un peu plus tardivement pour 6 p. 100 de réactif de F.C.

L'optimum se situe donc vers **3 à 5 p. 100 de réactif Folin-Ciocalteu.**

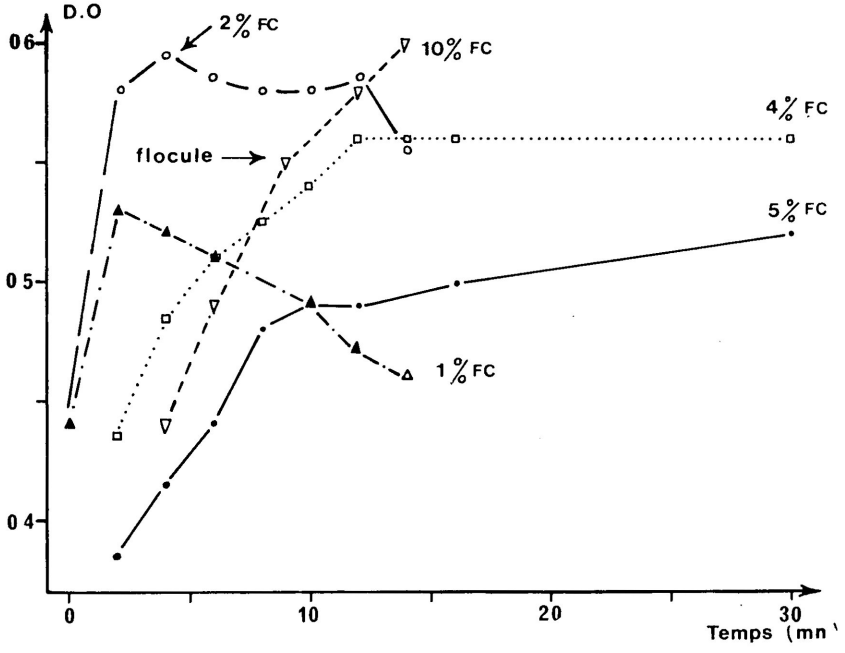


Fig. 2. — Evolution de la coloration de la réaction Folin-Ciocalteu en fonction du temps de chauffage

Concentration en Na_2CO_3

Les densités optiques sont supérieures pour des teneurs plus élevées en Na_2CO_3. On doit obtenir un pH supérieur à 9. On a :

— réactif F.C. 3 p. 100, Na_2CO_3 15 p. 100, pH 9,55

— réactif F.C. 5 p. 100, Na_2CO_3 20 p. 100, pH 9,00

Il faut donc une concentration **d'environ 4 p. 100 de Na_2CO_3 dans le milieu réactionnel.**

TABLEAU I

Densité optique après chauffage de 15 minutes à 70° C selon les concentrations en réactif de Folin-Ciocalteu et en Na_2CO_3.

p. 100 réactif F.C.	Na_2CO_3 à 20 p. 100	
	10 p. 100	20 p. 100
3	1,10	1,21
4	1,03	1,30
5	1,07	1,23

QUALITE DU REACTIF

On peut utiliser indifféremment du réactif préparé au laboratoire ou acheté prêt à l'emploi. Les résultats peuvent varier légèrement selon la qualité (mode de préparation, âge...) du réactif. Ce réactif doit être suffisamment frais, jaune à peine verdâtre. Un réactif trop vieux devenu vert donne des réactions incomplètes, des colorations verdâtres (et non bleues) et évoluant sans cesse. Dans tous les cas, il est recommandé d'établir un témoin à blanc et une gamme étalon avec le réactif utilisé.

STABILITE DE LA COLORATION

Dans les conditions proches de l'optimum, la coloration obtenue après chauffage est très stable pendant plusieurs heures, l'écart n'étant que de 1 à 2 p. 100 après 18 heures d'attente à la température ambiante.

TABLEAU II

Influence de la concentration en réactif de Folin-Ciocalteu et en Na_2CO_3, du temps de chauffage et de la longueur d'onde sur le dosage photométrique des polyphénols.

p. 100 réactif F.C.	3								5												Sommes
p. 100 Na_2CO_3 à 20 p. 100	15				20				15				20				25				des
Temps de chauffage	10	15	20	30	10	15	20	30	10	15	20	30	10	15	20	30	10	15	20	30	lignes
λ (nm)																					
700	0,560	0,580	0,608	0,588	0,560	0,550	0,535	0,526	0,577	0,575	0,596	0,639	0,572	0,600	0,628	0,660	0,605	0,600	0,619	0,590	11,768
730	0,582	0,600	0,627	0,608	0,580	0,562	0,558	0,549	0,610	0,615	0,635	**0,678**	0,615	0,632	0,665	**0,700**	0,637	0,630	0,630	0,600	12,313
740	0,582	0,600	0,628	0,608	0,580	0,568	0,560	0,550	0,610	0,625	0,642	**0,689**	0,622	0,647	0,672	**0,700**	0,642	0,635	0,635	0,622	12,427
750	0,582	0,600	0,628	0,609	0,580	0,560	0,559	0,550	0,625	0,632	0,655	**0,698**	0,630	0,650	**0,700**	**0,705**	0,648	0,640	0,639	0,628	12,518
760	0,582	0,600	0,622	0,602	0,577	0,562	0,559	0,549	0,630	0,637	0,657	**0,698**	0,635	0,655	**0,705**	**0,703**	0,648	0,640	0,639	0,628	12,528
770	0,575	0,590	0,612	0,595	0,572	0,560	0,552	0,542	0,625	0,637	0,657	**0,698**	0,635	0,652	**0,708**	**0,701**	0,641	0,638	0,632	0,622	12,444
790	0,557	0,570	0,591	0,572	0,560	0,535	0,537	0,525	0,617	0,627	0,645	**0,681**	0,620	0,640	**0,700**	**0,680**	0,620	0,615	0,612	0,602	12,106
Somme des colonnes	4,020	4,140	4,318	4,182	4,009	3,857	3,800	3,791	4,304	4,348	4,487	4,781	4,329	4,470	4,778	4,849	4,441	4,398	4,406	4,296	86,108

Les résultats en gras sont statistiquement équivalents

LES CONDITIONS OPTIMALES DE REACTION

Compte tenu des facteurs intervenant dans la réaction entre phénols et réactif de Folin-Ciocalteu et interférant entre eux, il est apparu intéressant d'effectuer une analyse statistique de ces facteurs. Le tableau II donne les résultats obtenus dans les conditions ci-dessous :

— réactif F.C. 3 et 5 p. 100

— Na_2CO_3 à 20 p. 100 : 15,20 et 25 p. 100 (soit 3, 4 et 5 p. 100 de Na_2CO_3 dans le milieu)

— temps de chauffage : 10, 15, 20, 30 minutes

— longueur d'onde de mesure : 700, 730, 750, 760, 770, 790 nm

— température de chauffage 80° C ± 1° C

Cette température a été retenue car elle donne des résultats légèrement plus élevés et plus rapides qu'à 70° C mais avec des risques d'apparition de troubles (non observés ici).

Nous faisons une analyse de bloc, sans répétition. La **variation totale** comprend la variation « réactifs-temps », la variation « longueur d'onde » et la variation due à l'erreur.

Elle est : $(0{,}560)^2 \times (0{,}582)^2 \ldots (0{,}622)^2 \times (0{,}602)^2 - c = 0{,}269992$

avec $c = \dfrac{(\Sigma x)^2}{N} = 52{,}96134$ et n degrés de liberté $= (7 \times 20) - 1 = 139$

La **variation « réactifs-temps »** est :

$$\frac{1}{7}\left[(4{,}020)^2 + (4{,}140)^2 \ldots\ldots (4{,}406)^2 + (4{,}296)^2\right] - c = 0{,}241208$$

avec $20 - 1 = 19$ degrés de liberté

La variation **« longueur d'onde » est :**

$$\frac{1}{20}\left[(11{,}768)^2 + (12{,}313)^2 \ldots (12{,}444)^2 + (12{,}106)^2\right] - c = 0{,}017940$$

avec $7 - 1 = 6$ degrés de liberté

D'où le tableau III récapitulatif.

TABLEAU III

Analyse statistique des facteurs de dosage

xxx très hautement significatif.

	Somme des carrés des écarts à la moyenne	Degrés de liberté	Carré moyen	F	
				théorique 1 %	calculé
Variation « réactifs-temps »	0,241208	19	0,012695	2,06	133×××
Variation « longueur d'onde »	0,017940	6	0,002990	2,99	31×××
Erreur	0,010844	114	0,000095	—	—
Variation totale	0,269992	139	—	—	—

On constate que le facteur « réactif-temps » a une influence hautement significative, de même que la longueur d'onde de mesure. Dans ces conditions, on doit retenir les combinaisons assurant la densité optique maximale.

Soit 5 p. 100 de réactif F.C., 20 p. 100 de Na_2CO_3 à 20 p. 100 et 20 minutes de chauffage avec lecture à 760 nm ou 30 minutes à 750 nm.

Le calcul de la « plus petite différence significative » = p.p.d.s. = F 1 p. 100 $\times \sqrt{2 \times \text{carré moyen de l'erreur}}$ permet de décider si des conditions proches sont également acceptables. On a :

p.p.d.s. « réactif-temps » $= 2{,}06 \times \sqrt{2 \times 0{,}000095} = 0{,}028$

p.p.d.s. « longueur d'onde » $= 2{,}99 \times \sqrt{2 \times 0{,}000095} = 0{,}041$

Sont donc valables les résultats compris entre 0,677 et 0,733 si l'on considère les « réactifs-temps » et ceux compris entre 0,664 et 0,746 si l'on considère la « longueur d'onde ». En retenant les deux critères, on peut adopter les modes opératoires suivants :

1/ réactif F.C. 5 p. 100 ; Na_2CO_3 15 p. 100 ;
chauffage 30 minutes ; λ de 730 à 790 nm

2/ réactif F.C. 5 p. 100 ; Na_2CO_3 20 p. 100 ;
chauffage 20 minutes ; λ de 750 à 790 nm

3/ réactif F.C. 5 p. 100 ; Na_2CO_3 20 p. 100 ;
chauffage 30 minutes ; λ de 730 à 790 nm

Les résultats étant un peu, mais non significativement différents, avec 20 p. 100 de Na_2CO_3 à 20 p. 100, on retiendra les principes suivants :

— longueur d'onde de mesure 760 nm
— réactif de Folin-Ciocalteu 5 p. 100
— Na_2CO_3 4 p. 100 du milieu
— chauffage 20 à 30 minutes

Par ailleurs, pour avoir des densités optiques lues convenables, le taux de tanin (exprimé en acide gallique) doit être inférieur à 1 g par litre de solution à doser (soit 10 mg par litre du milieu réactionnel) et de préférence situé vers 0,2 à 0,5 g par litre pour avoir la précision maximale.

CONCLUSION - MODE OPERATOIRE PROPOSE

L'étude critique de l'ensemble des facteurs du dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu permet de dégager des conclusions précises et de proposer un mode opératoire simple donnant des résultats sûrs. Il sera alors possible d'étudier le comportement des différents composés phénoliques du vin, seuls ou en mélange.

1/ La mesure doit se faire à 750 ou 760 nm ce qui demande un photomètre, ou à la rigueur un colorimètre, travaillant normalement à cette longueur d'onde un peu élevée.

2/ Le chauffage de 70 à 80° C pendant 20 à 30 minutes permet une réaction intense, rapide et stable. Cependant à 80° C on observe parfois, selon la qualité du réactif ou du vin, un trouble plus ou moins intense. Pour des raisons de simplification pratique, on doit préférer le chauffage à 70° C qui ne présente pas ces inconvénients.

3/ Il faut une concentration en réactif de Folin-Ciocalteu de 5 p. 100.

4/ La concentration du milieu réactionnel en Na_2CO_3 doit être de 3 à 4 p. 100.

5/ Dans ces conditions, la réaction donne une coloration intense et stable pour des concentrations en composés phénoliques pouvant atteindre au moins 10 mg par litre de milieu réactionnel.

6/ Compte tenu de l'intérêt d'utiliser le minimum de réactif de Folin-Ciocalteu, relativement couteux, et des possibilités de travailler en série avec des petits volumes en colorimétrie, nous proposons le mode opératoire suivant :

Mode opératoire

Dans une fiole jaugée de **20 ml,** on verse dans l'ordre :

— **0,2 ml** de vin (dilué au 1/5 pour les vins rouges)

— 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu

— Na_2CO_3 4,25 p. 100 q.s.p. 20 ml

après homogénéisation et transfert dans un tube à essai : porter au bain marie à 70° C ± 1° C pendant 20 minutes, refroidir sous un courant d'eau froide, colorimétrer à **760 nm,** sous un 1 cm, par rapport à un témoin sans tanin.

Soit **DO** la densité optique lue :

Indice Folin-Ciocalteu (I.F.C.) = DO × dilution

En reliant DO à une courbe étalon établie dans les mêmes conditions avec de l'acide gallique (ou de la D-Catéchine) on exprime le taux de composés phénoliques dans le vin en acide gallique (ou en D-catéchine).

Manuscrit reçu le 28 novembre 1972.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CANBAS A., 1971. Les facteurs de dissolution des composés phénoliques au cours de la vinification, Thèse Doct. Bordeaux.

MONTREAU F.R., 1972. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode de Folin-Ciocalteu, **Conn. Vigne Vin.**

RIBEREAU-GAYON P., 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges, **Chim. Anal., 52.**

SAPIS J.C. et RIBEREAU-GAYON P., 1968. Etude du brunissement des vins blancs, **Conn. Vigne Vin, 4,** 323-348.

SINGLETON V.L. et ROSSI J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagents, **Am. J. Enol., 16,** 144-151.