

### 30. Le microdosage iodométrique de l'acide pyruvique, du glucose et du mélange de ces deux substances<sup>1)</sup>

par Erwin Haag et Charlotte Dalphin.

(28 XII 42)

Certains microorganismes, cultivés en milieu synthétique glucosé, présentent le symptôme chimique de l'hypovitaminose B<sub>1</sub> — accumulation d'acide pyruvique — lorsque ce milieu ne contient pas d'aneurine. Pour étudier cette hypovitaminose, il a fallu entre autre, doser simultanément le glucose présent et l'acide pyruvique formé.

Le dosage de l'acide pyruvique ne fait pas de difficulté. La méthode de *Lu*<sup>2)</sup> en particulier, basée sur une réaction très sensible, est spécifique et favorable à ces recherches. Elle consiste à transformer l'acide pyruvique en 2,4-dinitrophénylhydrazone qui est séparée des autres corps présents, puis convertie en une substance colorée par addition de soude. Finalement ce corps coloré en rouge est dosé par colorimétrie.

Le dosage du glucose en présence d'acide pyruvique par contre est malaisé. Le glucose dévient la lumière polarisée et l'acide pyruvique ne la dévient pas, la méthode polarimétrique serait indiquée si les concentrations en glucose étaient élevées. Nos concentrations se chiffrant à quelques mg de glucose pour 10 cm<sup>3</sup>, cette méthode est inapplicable par défaut de sensibilité. D'autre part, les méthodes de dosage basées sur l'oxydabilité du glucose donnent des résultats entachés d'une erreur par excès, car l'acide pyruvique est oxydé en même temps que le glucose.

Connaissant la concentration en acide pyruvique, est-il possible de compenser l'erreur par une correction ?

Dans ce qui suit, nous avons étudié systématiquement ce problème. Dans ce dessein nous avons choisi la méthode de dosage la plus simple, c'est-à-dire l'iodométrie.

La technique employée est celle de *Kolthoff*<sup>3)</sup>: On ajoute à 10 cm<sup>3</sup> de solution à doser successivement 25 cm<sup>3</sup> de solution d'iode 0,01-n. et 5 cm<sup>3</sup> de NaOH 0,1-n. On bouche le flacon et on l'abandonne à l'obscurité à la température du laboratoire. Après un temps donné — *Kolthoff* indique 10 minutes — on acidifie par 10 cm<sup>3</sup> d'HCl 0,1-n. et on titre l'excès d'iode par le thiosulfate 0,01-n.

#### *Dosage de l'acide pyruvique.*

D'après *Wieland*<sup>4)</sup>, l'acide pyruvique est oxydé par l'hypoiodite en iodoforme et en acide oxalique. La réaction consomme

<sup>1)</sup> Travail effectué avec la subvention accordée à l'un de nous (*E. H.*) par la *Fondation Dr. Joachim de Giacomi* de la S.H.S.N.

<sup>2)</sup> *Biochem. J.* **33**, 249 (1939).

<sup>3)</sup> *Die Massanalyse II*, 485 (1931).

<sup>4)</sup> *A.* **436**, 229 (1924).

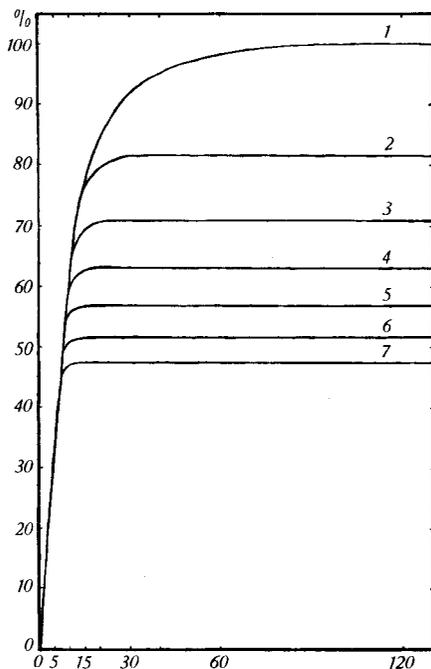
6 atomes d'iode pour 1 molécule d'acide pyruvique. Dans certaines conditions d'expérience, cette réaction fournit une méthode de dosage précise de l'acide pyruvique.

Voici la technique de *Wieland*: A 20 cm<sup>3</sup> de la solution à doser, on ajoute 20 cm<sup>3</sup> d'iode 0,1-n. et 5 cm<sup>3</sup> de NaOH n. Après 90 minutes, on acidifie et on titre l'iode libéré par le thiosulfate 0,1-n.

Nous avons fait la cinétique de cette réaction de *Wieland* mais en employant la technique de *Kolthoff*, par conséquent avec de l'iode 0,01-n. Le but était de déterminer d'une part le temps de réaction nécessaire, et d'autre part, la concentration maximum en acide pyruvique permettant le dosage quantitatif.

Les solutions ont été faites avec du pyruvate de sodium de *F. Hoffmann-La Roche*. Leur titre a été déterminé d'après *Wieland*.

Les résultats sont consignés dans le tableau I et dans le graphique No 1.



Graphique No 1.

Axe des abscisses: Temps de réaction en minutes.

Axe des ordonnées: Acide pyruvique dosé %.

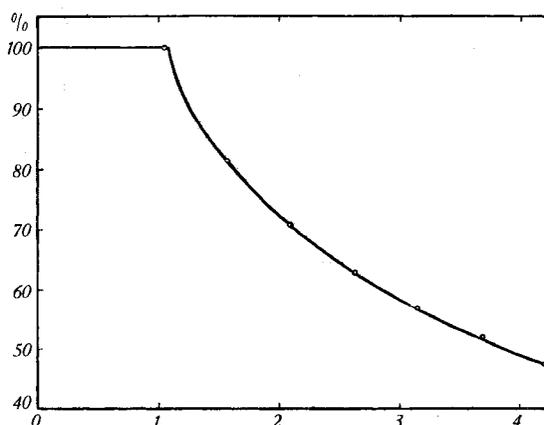
|                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1: Acide pyruvique présent = 1,05 mg | 4: Acide pyruvique présent = 2,63 mg |
| 2: „ „ „ = 1,58 „                    | 5: „ „ „ = 3,16 „                    |
| 3: „ „ „ = 2,10 „                    | 6: „ „ „ = 3,68 „                    |
| 7: Acide pyruvique présent = 4,21 mg |                                      |

Tableau I.

| Temps de<br>réaction<br>en minutes | Acide pyruvique dosé % |      |      |      |      |      |      |
|------------------------------------|------------------------|------|------|------|------|------|------|
|                                    | mg acide pyruvique mis |      |      |      |      |      |      |
|                                    | 1,05                   | 1,58 | 2,10 | 2,63 | 3,16 | 3,68 | 4,21 |
| 5                                  | 34,0                   | 27,0 | 35,5 | 34,0 | 28,5 | 34,0 | 29,0 |
| 10                                 | 58,0                   | 57,5 | 60,0 | 56,5 | 57,0 | 51,0 | 46,5 |
| 15                                 | 73,0                   | 70,0 | 71,0 | 61,0 | 55,5 | 50,5 | 47,5 |
| 20                                 | 85,0                   | 78,0 | 71,0 | 63,0 | 56,5 | 51,5 | 48,0 |
| 30                                 | 93,0                   | 78,5 | 70,0 | 64,5 | 55,5 | 51,0 | 48,0 |
| 40                                 | 96,5                   | 82,5 | 71,5 | 62,5 | 57,5 | 52,5 | 46,5 |
| 60                                 | 97,0                   | 79,0 | 69,5 | 65,0 | 57,0 | 51,5 | 47,5 |
| 120                                | 101,0                  | 83,0 | 71,0 | 63,0 | 56,0 | 52,0 | 47,0 |

Quoiqu'il y ait eu pour chaque concentration en acide pyruvique plus que la quantité stoechiométrique d'iode, la réaction n'est quantitative que pour la concentration la plus faible. Il faut donc un grand excès d'iode si on veut que la réaction aille jusqu'à son terme. Si l'excès d'iode est insuffisant, la réaction s'arrête après un temps déterminé. Cet arrêt se fait à une valeur bien déterminée du % d'acide pyruvique dosé. Cette valeur est *caractéristique* de la concentration en acide pyruvique. Elle est atteinte après des temps variables, également caractéristiques de la concentration en acide pyruvique, pour rester ensuite constante.

Les résultats ci-dessus permettent de tracer pour chaque temps la courbe de l'«Acide pyruvique dosé %» en fonction de la concentration en acide pyruvique. Le graphique No 2 représente la courbe pour une durée de réaction de 90 minutes.



Graphique No 2.

Axe des abscisses: mg acide pyruvique présent.  
Axe des ordonnées: Acide pyruvique dosé %.

Il résulte du graphique No 2 que l'on dose quantitativement l'acide pyruvique en employant la technique que *Kolthoff* a indiquée pour le glucose, si la quantité d'acide pyruvique est inférieure à 1,1 mg. Puisque 1 cm<sup>3</sup> d'iode 0,01-n. correspond à 0,1467 mg d'acide pyruvique, on est certain d'avoir un résultat quantitatif si le nombre de cm<sup>3</sup> de thiosulfate lors du titrage de l'excès d'iode après acidification est supérieur à (25 - 1,1/0,1467) = 17,5. Par conséquent, s'il faut moins de 17,5 cm<sup>3</sup> de thiosulfate, il faut refaire le dosage avec une solution plus diluée d'acide pyruvique.

Notons que la forme mathématique de la courbe du graphique No 2 est

$$y = p \cdot x - \frac{1}{3} + c;$$

si x représente le nombre de mg d'acide pyruvique et y l'«Acide pyruvique dosé %», p est égal à 144,9 et c à -42,3.

#### *Dosage du glucose.*

D'après ce qui précède, il faut un temps de réaction de 90 minutes pour obtenir un résultat quantitatif dans le dosage de l'acide pyruvique. Si on désire que la correction due à la présence de l'acide pyruvique, lors du dosage du glucose dans des mélanges glucose-acide pyruvique, corresponde à un dosage quantitatif de l'acide pyruvique, il faut envisager pour ces mélanges, une durée de réaction de 90 minutes. La question se pose alors de savoir si la réaction de l'hypoiodite avec le glucose ne va pas plus loin qu'au stade acide gluconique lorsqu'on prolonge la durée d'expérience de 10 minutes — prescrite par *Kolthoff* — à 90 minutes. En d'autres termes, il faut vérifier s'il y a encore une consommation d'iode lorsqu'on abandonne le mélange réactionnel plus longtemps que 10 minutes.

Nous avons donc fait la cinétique de cette réaction. La concentration en glucose a été d'environ 4 mg pour 10 cm<sup>3</sup>. Nous servant des résultats des titrages nous avons calculé le « Glucose dosé % » en posant arbitrairement 100 % le résultat obtenu après 15 minutes.

Le tableau II résume les résultats obtenus.

Tableau II.

| Temps     | Glucose dosé % |
|-----------|----------------|
| 4 minutes | 87,1           |
| 8    "    | 95,7           |
| 10   "    | 97,9           |
| 15   "    | 100,0          |
| 20   "    | 100,6          |
| 30   "    | 100,6          |
| 40   "    | 100,6          |
| 60   "    | 99,4           |
| 90   "    | 101,8          |
| 120  "    | 98,8           |

Les écarts trouvés n'étant pas supérieurs aux erreurs d'expériences (une erreur de mesure de 0,05 cm<sup>3</sup> d'iode ou de thiosulfate entraîne une erreur de 1,1 % sur la valeur « Glucose dosé % »), nous en déduisons qu'on peut abandonner le mélange réactionnel jusqu'à 2 heures sans risque d'erreur.

*Dosage du glucose en présence d'acide pyruvique.*

Les résultats ci-dessus acquis, nous avons procédé au dosage de mélanges de glucose et d'acide pyruvique. La technique a été la même, le temps pendant lequel on abandonne le mélange réactionnel étant de 90 minutes. Les calculs ont été faits en admettant que le glucose est dans tous les cas quantitativement dosé. Ceci permet de calculer les valeurs de l'« Acide pyruvique dosé % ».

Dans le tableau III qui résume les résultats obtenus, nous avons également noté le nombre de cm<sup>3</sup> de thiosulfate nécessaires pour titrer l'excès d'iode libéré après acidification.

Tableau III.

| Glucose mis | Acide pyruvique mis | Thiosulfate <sup>1)</sup> | Acide pyruvique dosé % |
|-------------|---------------------|---------------------------|------------------------|
| 5,63 mg     | 1,307 mg            | 13,55 cm <sup>3</sup>     | 58,0                   |
| 5,63 „      | 0,980 „             | 14,35 „                   | 65,5                   |
| 5,63 „      | 0,653 „             | 15,05 „                   | 82,5                   |
| 5,63 „      | 0,327 „             | 16,60 „                   | 95,0                   |
| 3,75 „      | 1,307 „             | 15,10 „                   | 64,5                   |
| 3,75 „      | 0,980 „             | 15,80 „                   | 75,5                   |
| 3,75 „      | 0,653 „             | 16,55 „                   | 96,0                   |
| 3,75 „      | 0,327 „             | 18,55 „                   | 101,5                  |
| 1,88 „      | 1,307 „             | 16,45 „                   | 72,5                   |
| 1,88 „      | 0,980 „             | 17,45 „                   | 82,0                   |
| 1,88 „      | 0,653 „             | 18,45 „                   | 100,5                  |
| 1,88 „      | 0,327 „             | 20,65 „                   | 101,0                  |

L'examen de ce tableau fournit la solution pratique du problème posé dans ce travail.

En effet, si on abandonne le mélange réactionnel 90 minutes et si le nombre de cm<sup>3</sup> de thiosulfate nécessaires au titrage de l'excès d'iode est supérieur à 18, on est certain que les deux constituants du mélange sont dosés quantitativement. Connaissant la quantité d'acide pyruvique présent et sachant qu'une molécule d'acide pyruvique consomme 6 atomes d'iode, on peut calculer la quantité d'iode consommée par le glucose et partant, la quantité de glucose présente dans le mélange.

Institut de Botanique Générale, Université de Genève.

<sup>1)</sup> Calculé en thiosulfate 0,01-n. à partir des mesures expérimentales faites avec du thiosulfate approximativement 0,01-n.