

CHROM. 3426

## LE DOSAGE AUTOMATIQUE DES ACIDES ORGANIQUES\*

J. CARLES

*Laboratoire de Physiologie végétale, Institut catholique de Toulouse\*\* (France)*

(Reçu le 22 janvier 1968)

## SUMMARY

*The automatic determination of organic acids*

The determination of organic acids after column chromatography is automated, by use of a pH 8 buffer which permits the colorimetric estimation of the decolorisation of a dye, phenol red, and the measurement of the variations in pH due to the organic acids emerging from the column. The determination is made in 6 h in four different ways, and the sensitivity is well below a microequivalent.

Étant donnée l'importance qu'ils ont dans le métabolisme animal et végétal, les acides organiques sont très étudiés mais les méthodes chromatographiques de dosage sont restées jusqu'ici assez rudimentaires. Ce travail présente un premier essai pour l'introduction des procédés automatiques dans ce domaine où les difficultés et les problèmes à résoudre n'ont pas manqué. Les solutions proposées ne sont sûrement pas les solutions idéales, mais elles ont le mérite de donner des résultats satisfaisants.

Les méthodes employées jusqu'ici peuvent se ramener à deux, suivant qu'elles utilisent la chromatographie sur silice avec gradient de butanol dans le chloroforme, ou bien la chromatographie sur résines anioniques avec un gradient d'acides volatils.

Dans les deux cas le dosage des acides organiques en solution aqueuse se fait volumétriquement par une solution alcaline, mais il faut dans le second cas faire évaporer d'abord l'acide volatil qui formait le gradient.

Nous avons choisi la première méthode parce qu'elle est applicable aux acides volatils, mais surtout parce qu'il est plus facile de se débarrasser du chloroforme que des acides volatils<sup>1</sup>.

## MODE OPÉRATOIRE

Des flacons contiennent les différents solvants chloroformiques qui doivent entraîner progressivement les acides organiques, grâce à un gradient obtenu par des quantités croissantes de butanol, soit 4 %, 8 %, 12 % et 50 %.

Ce liquide est conduit au bout de la colonne de chromatographie par un tube acidflex (résistant au chloroforme) qui traverse un programmateur chargé d'ouvrir

\* Dédié à M. le Professeur E. LEDERER à l'occasion de son 60ème anniversaire.

\*\* Réalisation technique et mise au point par M. VIAU, I. C. DE L'ENSCT.

ou de fermer le passage. Une boule de mélange et de sécurité reçoit les solvants qui vont passer dans la colonne.

À la sortie de la colonne, le solvant est repris par une pompe proportionnante et mélangé à de l'eau dans laquelle passent les acides organiques, grâce à un mélangeur. Un séparateur élimine alors le solvant chloroformique, avec assez d'eau pour qu'en aucune circonstance il ne reste de chloroforme dans la partie de la solution aqueuse que l'on envoie dans le circuit d'analyse (Fig. 1).

Tandis que la partie éliminée est recueillie sur un collecteur de fractions, le flux de la solution aqueuse d'acides est divisé en deux ou même trois courants qui sont mélangés à un tampon de pH 8 coloré par du rouge de phénol. Lorsque dans le flux apparaît un acide organique, le tampon est neutralisé proportionnellement à l'importance de l'acide et la couleur rouge tend à disparaître. Un colorimètre muni d'un filtre de  $550\text{ m}\mu$  mesure cette disparition qu'inscrit un enregistreur.

Un des tampons est assez faible pour inscrire les plus petites arrivées d'acide, tandis qu'un autre ne commence à réagir que pour des pics assez importants, et l'on peut en mettre un troisième pour les pics encore plus importants.

Sur le trajet d'un de ces tampons, on place un pH-mètre enregistreur qui inscrit es variations du pH des acides présents.

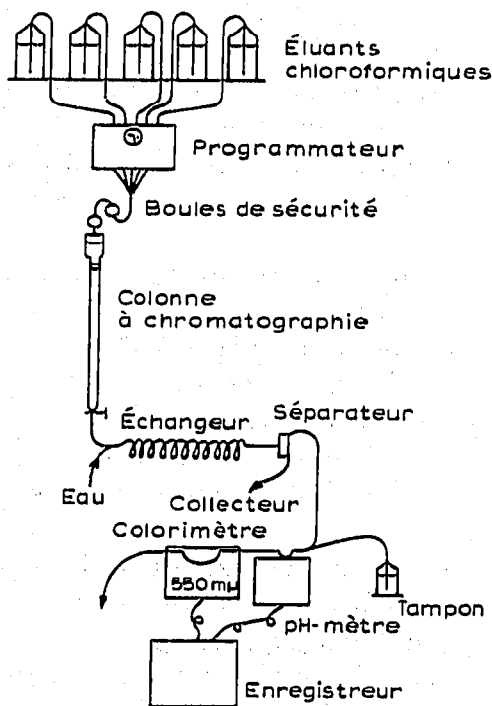


Fig. 1. Plan général du montage.

#### PRODUITS ET RÉACTIFS

Acide sulfurique 0.5 N et 5 N.

Soude 0.005 N.

Rouge de phénol 100 mg de colorant sont broyés dans un mortier avec 3 ml d'eau et 3 ml de soude 0.1 N; ajouter de l'eau jusque'à 250 ml.

### *Solution tampon de pH 8*

Elle est préparée avec 54 % de borax 0.05 *M* et 46 % de phosphate monopotassique 0.1 *M*. Pour un litre de tampon, on prend 30 ml de rouge de phénol et une plus ou moins grande quantité de solution suivant qu'on veut un tampon faible ou fort; nous utilisons 8 ml pour le tampon faible et 30 ml pour le tampon fort. On ajuste au besoin le pH pour qu'il soit assez exactement de 8.

### *Solvants*

Ils sont tous à base de chloroforme auquel on ajoute une quantité plus ou moins grande de butanol avec un peu d'acide sulfurique pour éliminer tout ce qui pourrait neutraliser les acides organiques et pour saturer la phase mobile qui doit être en équilibre avec la phase stationnaire: on agite pendant 1 ou 2 min le solvant avec un dixième de son volume en acide sulfurique 0.5 *N*, on laisse reposer et on décante.

Les mélanges que nous avons le plus fréquemment employés sont à 4 % de butanol pendant 50 min, 8 % pendant 50 min, 12 % pendant 100 min et 50 % pendant 120 à 130 min.

## APPAREILLAGE

### *Colonne à chromatographie*

Choisie assez petite pour que le temps de passage soit plus court, et pour qu'on ait besoin de moins de produit, elle suffit largement pour la séparation des acides organiques les plus communs et présente même plus d'efficacité que les colonnes ordinairement employées puisqu'elle sépare fort bien par exemple l'acide lactique de l'acide succinique<sup>2</sup>.

Cette colonne d'une vingtaine de centimètres de longueur pour une section d'un demi centimètre carré est élargie dans sa partie supérieure pour recevoir facilement un bouchon avec une double boule de verre dans lesquels les solvants arrivent et se mélangent, le solvant le plus léger arrivant par en dessous; cette boule fait encore office de sécurité dans le cas anormal d'un arrêt momentané du solvant.

La colonne est chargée de 3 g de célite 535 qu'on acidifie avec 1.5 ml d'acide sulfurique 0.5 *N* et qu'on met en suspension dans un peu de chloroforme; on tasse légèrement et d'une manière homogène avec un piston de verre.

Au sommet de la colonne, on place une quantité d'acides organiques correspondant au moins à 0.1 méquiv., dissous dans 0.15 ml d'acide sulfurique 5 *N* qui libère au besoin les acides de leurs sels, mélangés à 0.3 g de célite et introduits, avec un peu de chloroforme au sommet de la colonne. On recouvre le tout avec une petite rondelle de papier filtre surmonté d'un léger tampon de laine de verre pour que ne soit pas troublée l'horizontalité de la surface supérieure de la célite.

### *Programmeur*

Mis au point pour rendre automatique le dosage des acides aminés avec un appareil Technicon, cet appareil, par une série de cames ou de contacts fait passer ou interrompt aux heures prévues les solvants successifs et les fait arriver sur telle ou telle colonne.

Il est commandé par un interrupteur horaire qui permet de programmer avec

précision les temps de passage sur chaque colonne et de changer de colonne à la fin de chaque dosage.

Le C.N.R.S. a déposé pour ce programmateur un brevet d'invention sous le numéro 12.026.

### Colorimètre

Le circuit d'analyse Technicon est utilisé avec sa pompe proportionnante qui règle les débits, avec ses bobines de mélange qui font passer les acides organiques du butanol chloroformique à l'eau, avec ses colorimètres que l'on munit de filtres à  $550\text{ m}\mu$  avec son enregistreur à 2 ou 3 points.

Comme l'indique le schéma (Fig. 2), l'éluant est pris à la sortie de la colonne par un tube acidflex 0.45 (d'un débit réel de 0.80 ml/min) auquel on ajoute 1.60 ml/min d'eau et qu'on fractionne avec un peu d'air pour que la circulation soit plus régulière.

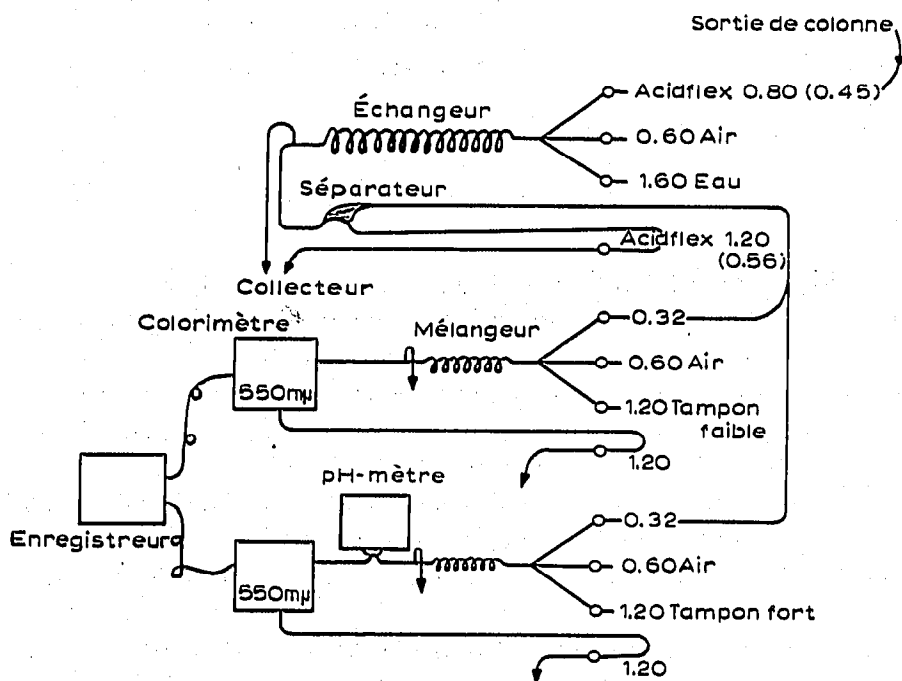


Fig. 2. Schéma du circuit d'analyse. Les chiffres indiquent le débit en ml par min. La série des ronds représente le passage des tuyaux dans la pompe proportionnante.

Le tout passe dans un échangeur à billes qui fait entrer le butanol chloroformique intimement en contact avec l'eau qui prend ainsi tous les acides organiques beaucoup plus solubles en elle. A la sortie de l'échangeur, on enlève les bulles. Le liquide est alors envoyé dans un séparateur où l'on ne prend qu'une partie relativement faible de l'eau pour ne pas courir le risque de prendre un peu de chloroforme. Le chloroforme avec le reste de l'eau est envoyé dans le collecteur où l'on dirige aussi l'eau du débulleur tandis que le flux aqueux débarrassé du chloroforme est divisé en deux et mélangé à un tampon coloré fort ou faible (1.20 ml pour 0.32 ml de liquide et un peu d'air). Le flux traverse un mélangeur, les bulles sont enlevées et le flux dirigé vers le colorimètre dont les mesures sont enregistrées. On intercale le pH mètre juste avant le colorimètre, sur le tampon fort ordinairement.

### *Collecteur de fractions*

N'importe quel collecteur de fraction peut être utilisé. Le plus indiqué pour qu'on puisse trouver immédiatement le tube intéressant est celui qui se règle par le temps, mais l'on peut aussi se servir d'un appareil qui compte les gouttes ou apprécie les volumes par suite de la parfaite régularité du débit que maintient la pompe proportionnante.

### *pH mètre*

Cet appareil que l'on place ordinairement sur le tampon fort, juste avant le colorimètre, doit être muni d'un enregistreur et pouvoir apprécier d'une façon continue le pH d'une solution passant sur ses électrodes. Il est bon qu'on puisse déplacer son champ de mesure de telle sorte que l'on puisse faire coïncider le pH 8 avec le bas du papier enregistreur. Il est intéressant enfin qu'on puisse faire passer dans cet appareil le flux qui va vers le colorimètre sans que celui-ci en soit troublé.

Nous utilisons, sans qu'il ait besoin d'aucune modification, le pH mètre Beckman modèle Expandomatic muni de son dispositif permettant la mesure à l'abri de l'air du pH sanguin.

## LES DOSAGES

### *Le dosage colorimétrique*

Le colorant employé est le rouge de phénol, le colorant même qui sert d'indicateur pour le dosage titrimétrique et dont la zone de virage se trouve à un pH assez alcalin pour que tous les acides organiques puissent le faire virer. Cette zone de virage se situe entre 6.8 et 8.4. Nous avons choisi le pH de 8, plus près de la limite supérieure, mais assez proche de la zone la plus sensible, pour qu'avec le champ le plus large possible reste très grande la sensibilité.

Puisque le rouge de phénol devient jaune en milieu acide nous utiliserons un filtre de 550 m $\mu$  d'un jaune très légèrement vert qui sera très transparent à la lumière jaune: la densité optique deviendra de plus en plus faible dans la mesure où le rouge disparaîtra.

Au lieu de partir, comme dans les dosages colorimétriques ordinaires d'une densité optique nulle, nous partons d'une assez forte coloration et c'est la diminution de cette coloration qui est mesurée, la diminution de la densité optique. Cette diminution se fait d'une façon linéaire jusqu'aux environs du pH 6.8 où cette disparition devient asymptotique: le tampon employé ne permettra la mesure que s'il n'arrive pas jusqu'à ce pH, et c'est pourquoi ce tampon devra être d'autant plus fort que la quantité d'acides présents dans le milieu analysé sera plus grande.

Par suite des montages mécaniques, l'inscription des courbes sur les enregistreurs est logarithmique, mais c'est ici le point de départ qui est comprimé: il suffira pour rétablir les vraies valeurs d'utiliser un papier d'inscription semi-logarithmique et de compter les déviations, non pas en longueurs mesurées mais suivant les divisions du papier. Pourvu qu'on n'arrive pas trop près de la décoloration totale, cette manière de compter donne des résultats très satisfaisants.

Pour obtenir des valeurs chiffrées, on multiplie le nombre de divisions qu'atteint la hauteur du pic par sa largeur en mm prise à sa demi-hauteur. Il suffit alors de donner une signification précise à cette série de valeurs comparables entre elles, en

les étalonnant en valeur absolue, en milliéquivalents, pour obtenir directement soit la quantité passée dans le colorimètre, soit la quantité présente dans l'échantillon placé sur la colonne.

Le second tampon dont la valeur est établie de telle sorte qu'il donne des pics mesurables sitôt que le faible est près d'être saturé, permettra par les pics mesurables sur les deux courbes de trouver le rapport entre les acides les plus abondants mesurables sur les deux courbes de trouver la rapport entre les acides les plus abondants mesurables seulement sur le tampon fort et ceux qui le sont beaucoup moins et qui n'apparaissent que sur le tampon faible.

#### *Le dosage potentiométrique*

Lorsqu'un acide arrive dans un milieu tamponné, le pH de ce milieu varie suivant la quantité de l'acide. Cette variation est pratiquement linéaire et cette linéarité se maintient, non pas seulement comme pour la disparition de la couleur du rouge de phénol jusqu'aux environs de pH 6.8, mais bien au delà jusqu'à une limite qui varie suivant le  $pK$  de l'acide. Comme les tampons utilisés permettent de se maintenir assez loin du  $pK$  des acides mesurés, la courbe sera normalement linéaire sur toute sa hauteur et la surface d'un pic pourra être mesurée soit avec le planimètre, soit avec l'intégrateur, soit en multipliant la hauteur en mm par la largeur en mm prise à mi-hauteur.

Si le pH mètre est placé sur un tampon faible et vite saturé, les courbes plafonneront à des niveaux différents suivant le  $pK$  des acides, et ceci peut servir à en identifier certains.

#### *Le dosage titrimétrique*

Nous retrouvons ici la méthode classique de dosage, la seule qui ait été utilisée jusqu'ici. Les acides présents dans l'eau au dessus du chloroforme, sont dosés avec de la soude 0.005  $N$  et l'on obtient la courbe classique par paliers de 5 ou 10 min, beaucoup moins précise évidemment que le dosage instantané et peu utilisable sur des valeurs faibles par suite de l'importance de la ligne de base.

Cette courbe pourra être intéressante de temps à autre, soit pour vérifier la valeur des autres courbes obtenues sur les enregistreurs, soit pour doser certains pics trop abondants qui ont saturé même le tampon le plus fort, soit enfin pour étalonner en valeurs absolues les valeurs obtenues sur les enregistreurs.

Ordinairement de tels dosages seront inutiles et l'on pourra, sans les avoir dosés, récupérer à l'état pur, en solution dans l'eau, tel ou tel acide intéressant dont on aura précisé l'heure de sortie d'après les enregistreurs.

#### DISCUSSION

Par suite des multiples dosages qui peuvent être simultanément menés à bien, cet ensemble paraît complexe. Il est pourtant fort simple et les accessoires qu'il comporte sont d'un prix tout à fait modique.

Nous allons considérer et discuter pour l'ensemble de cette méthode: l'automatisation et son réglage, la précision obtenue et la sensibilité, la fidélité de ces dosages et les possibilités de comparaison qu'il offre.

*Automatisation*

Le premier avantage de ce dosage est d'être automatique. Ces dosages peuvent être multipliés puisqu'il suffit de préparer les colonnes et les solvants, et les opérations se poursuivront aussi bien la nuit que le jour au rythme de 6 h pour l'un, d'un jour pour quatre, à moins qu'on ait réglé autrement le programmeur.

Les acides organiques étant très différents dans les milieux que l'on peut étudier, il est impossible de fixer un programme qui soit toujours valable et si l'on change de milieu, il convient de reconsidérer la concentration et le temps de passage des solvants. Un des programmes que nous avons utilisé assez souvent pour les acides organiques végétaux comporte 50 min avec 4% de butanol, 50 min avec 8%, 100 min avec 12% et 120 à 150 min avec 50%. Les acides organiques sortent dans un ordre toujours identique et à des intervalles qui sont précisés dans le tableau I. Il est bien évident que cette séquence, surtout avec ce passage abrupt

TABLEAU I

HORAIRE DE SORTIE DES ACIDES ORGANIQUES DANS LES CONDITIONS INDIQUÉES (HEURES. MINUTES)

<i>Acide</i>		<i>Acide</i>	
Hippurique	0.20	Diméthylglycérique	2.55
Acétique	0.25	Aconitique	3.00
Adipique	0.45	Oxalique	3.30
Formique	0.55	Glycolique	3.45
Fumarique	1.10	Citramalique	3.50
Lactique	1.50	Malique	4.00
Succinique	2.10	Citrique	4.25
Pyrrolidone carboxylique	2.20	Shikimique	4.40
Cétoglutarique	2.30	Glycérique	4.50
Malonique	2.45	Tartrique	5.20

de 12 à 50% de butanol, ne peut être utilisé si les acides organiques sont nombreux entre l'acide succinique et l'acide malique, car plusieurs risquent d'être bousculés par la sortie trop rapide de l'acide malique.

Le principe essentiel pour mieux séparer certains acides ou bien pour décongestionner une période est de prolonger le temps du solvant précédent, ou bien de faire passer pendant un certain temps du chloroforme pur si le début est surchargé.

*Précision et sensibilité*

Il convient de signaler tout d'abord la précision dans la séparation des acides, bien meilleure du fait qu'elle ne se fait plus rythmiquement par prises qui représentent 3 ou 5 min d'écoulement, mais d'une manière continue, tant et si bien qu'une baisse est visible, même si elle n'a duré qu'une minute ou deux. Si la fraction du collecteur ne se situe pas exactement au centre de la baisse qui sépare deux pics, la courbe obtenue par titrimétrie risque de ne pas représenter deux pics mais un plateau, ou un aspect tout à fait quelconque.

Plus intéressante encore est la précision pour les acides présents en quantité très faible. La soude utilisée pour le dosage classique est très diluée pour obtenir la plus grande sensibilité possible: avec 0.005 N, un ml équivaut à 5 microéquivalents

et la plus faible sensibilité paraît être obtenue avec deux gouttes soit un demi microéquivalent; or cette très faible quantité d'acide donne sur la courbe un pic de plusieurs  $\text{cm}^2$ . Un dixième de microéquivalent ou même un centième est facilement dosable et une bien plus petite quantité nettement discernable, et c'est ici que devient importante l'élimination du facteur humain. De très légères déviations de la courbe que l'on retrouve comparativement sur les courbes voisines ou bien que l'on voit croître d'une courbe à l'autre, donnent à ce dosage une irremplaçable valeur.

#### *Fidélité et comparaison*

Si l'on n'a d'une substance qu'un seul dosage il est nécessairement considéré comme valable mais cette valeur gagnerait souvent à être confirmée. C'est ce qui peut l'être facilement dans cette méthode où l'on peut au besoin comparer quatre dosages simultanés.

Pour vérifier la valeur des dosages, nous avons fait une solution standard avec quelques-uns des acides les plus répandus dans le matériel biologique. Les 2 ml placés sur la colonne contenaient six acides dont la teneur se situait entre 20 et 75 microéquivalents.

La première question est de savoir s'ils sont tous également dosés. Comparons ces dosages à celui d'un étalon interne l'acide malique dont nous prenons la quantité égale à 100 (Tableau II). L'acide adipique représente dans l'échantillon un peu moins de la moitié soit 49. Les chiffres du dosage retrouvent à peu près ce nombre soit 49.2 de l'aci-

TABLEAU II  
DOSAGE COMPARATIF SUR TAMPON FORT

Acides:	Adi- pique	Fuma- rique	Succi- nique	Ma- lique	Ci- trique	Tar- trique
mg. pour 100 ml d'échantillon	88	66	221	164.5	76	162
Relation à l'acide malique dans l'échantillon	49	47	153	100	44	88
Avec le colorimètre	44	45.3	150	100	46.5	89.1
Avec le pH mètre	49.2	48.8	151.6	100	47.1	90.6
Microéquivalents dans 2 ml d'échantillon	24	22.8	75	49	21.5	43.2
Dosage avec le colorimètre	21.8	22	73.7	48.5	22.7	43.8
Dosage avec le pH mètre	24.1	23.6	74.3	49.4	22.9	44.2

dité du malique avec le pH mètre, et seulement 44 avec le colorimètre. Avec l'acide fumarique nous trouvons la même tendance à être légèrement supérieure avec le pH et inférieure avec la couleur. L'ensemble paraît donc satisfaisant et serait même plus précis et plus fidèle que le dosage titrimétrique où le niveau de base est parfois difficile à situer.

Nous pouvons donc étalonner la valeur de la courbe sur n'importe quel acide ou bien sur l'ensemble, et nous n'aurons pas besoin d'utiliser un coefficient de correction pour tel ou tel acide, comme il conviendrait de le faire avec un dosage titrimétrique.



Considérons un exemple concret. La solution standard mise sur la colonne à chromatographie contenait dans ses 2 ml, 1.32 mg d'acide fumarique soit 22.8 microéquivalents, ce qui devrait correspondre à 4.5 ml de soude 0.005 *N* ou bien comme il en arrive seulement la moitié sur le collecteur à un peu plus de 2 ml. Sur la courbe du pH mètre la surface couverte par ce pic est de 195 mm<sup>2</sup> (elle aurait pu être rendue mécaniquement plus grande en choisissant une plus grande sensibilité) et ceci pour un volume de liquide trois fois moins grand que sur le collecteur. Pour cette même quantité, soit 3.8 microéquivalents, le tampon fort donne un pic de 540 unités dont la surface est de 500 mm<sup>2</sup> et le tampon faible 2.300 mm<sup>2</sup>. Nous pouvons donc dire que sur cette dernière courbe 1 microéquivalent donne une surface de 600 mm<sup>2</sup> alors que cette même quantité demanderait seulement 0.2 ml de soude.

Cette sensibilité permet des dosages que sans cela il aurait été impossible d'envisager. Ainsi pour un dosage effectué avec M. Viala sur un matériel provenant d'une culture de *Leptosphaeria*, et qui représentait environ un demi-gramme de poids sec, nous avons pu extraire et doser les acides organiques sur les trois courbes (Fig. 3)

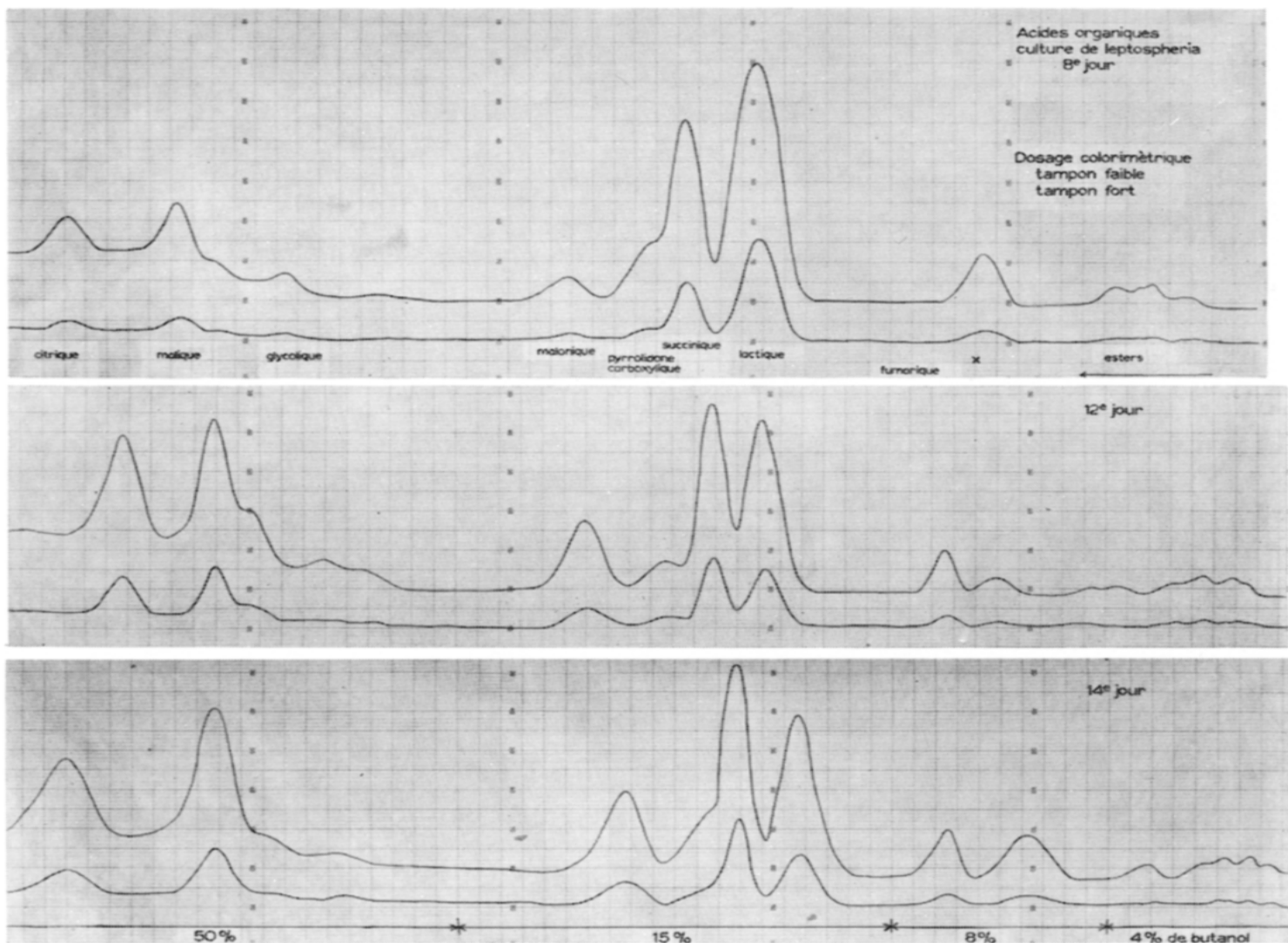


Fig. 3. Courbes colorimétriques comparées de trois dosages d'acides organiques de *Leptosphaeria* à trois jours différents (juxtaposées dans la même photographie).

obtenues à des jours différents. La somme totale des acides enregistrés sur chacune de ces courbes se situe entre 10 et 14 microéquivalents et si nous prenons quelques exemples nous voyons l'acide malonique passer de 0.01 à 0.05 et à 0.1 ; l'acide lactique baisse et passe de 2 à 0.9 et 0.8 microéquivalents tandis qu'apparaît l'acide fumarique et qu'augmentent les acides succinique, malique et citrique.

La courbe colorimétrique n'enregistre que la sixième partie de la quantité totale de l'échantillon mais la précision et la fidélité sont telles que cette faible partie suffit amplement aux mesures.

En pratique les quantités d'acides organiques sont toujours comparables entre elles à l'intérieur de la courbe, mais si l'on veut les rapporter à l'échantillon, il convient dans notre montage, de multiplier par six ces valeurs.

#### CONCLUSION

Le dosage complexe que nous présentons est intéressant parce qu'avec un matériel très modique, il permet d'automatiser les dosages d'acides organiques qui se font au rythme d'une analyse toutes les 6 h. Les moindres traces d'acide même inférieures au microgramme, sont discernables et comparables d'un chromatogramme à l'autre ; et l'on peut recueillir pur en solution aqueuse n'importe quel acide organique qui se trouve dosé simultanément par ailleurs sur les colorimètres et le pH mètre avec trois enregistrements de sensibilité différente.

#### RÉSUMÉ

Le dosage des acides organiques après chromatographie sur colonne est automatisé, grâce à l'emploi d'un tampon à pH 8 qui permet soit d'apprécier au colorimètre la décoloration d'un colorant, le rouge de phénol, soit de mesurer les variations du pH lorsqu'arrivent les acides organiques sortant de la colonne. Le dosage se fait en 6 h de quatre manières différentes et la sensibilité descend bien au dessous du microéquivalent.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. CARLES ET M. VIAU, *Symp. Technicon sur l'Automatisation en Chimie analytique. Brighton, 1967.*
- 2 J. CARLES ET A. ALQUIER-BOUFFARD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, No. 7 (1967) 1519.

*J. Chromatog.*, 35 (1968) 158-167