

CHROM. 475I

## IDENTIFICATION DES ACIDES ORGANIQUES ET ÉVALUATION DE LEURS TENEURS INDIVIDUELLES DANS LES JUS DE RAISIN ET LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE ET PHOTODENSITOMÉTRIE

M. BOURZEIX ET J. GUITRAUD\*

*Institut National de la Recherche Agronomique, Station Centrale de Technologie des Produits Végétaux, 11 Narbonne (France)*

ET

F. CHAMPAGNOL

*Institut National de la Recherche Agronomique, Station de Recherches Viticoles, Centre de Recherches Agronomiques, 34 Montpellier (France)*

AVEC LA COLLABORATION TECHNIQUE DE N. HEREDIA

(Reçu le 19 Décembre 1969; manuscrit modifié reçu le 25 Mars 1970)

---

### SUMMARY

*Identification of organic acids and determination of their individual amounts in grape-juices and wines by chromatography and photodensitometry*

Tartaric, malic, lactic, succinic, citric and citromalic acids are identified by separation with one-dimensional thin-layer chromatography on cellulose. The individual amounts are determined by photodensitometry of the spots.

The method is applicable to the free acids and their salts present in wines, grape-juices or vegetable extracts.

---

### INTRODUCTION

Parmi les nombreuses méthodes de séparation des acides organiques sur papier ou sur couche mince, certaines permettent la séparation d'un nombre important d'acides grâce à l'emploi de deux solvants migrant selon deux dimensions du support (CARLES *et al.*<sup>1</sup>). D'autres, n'utilisent qu'une seule migration: RASMUSSEN<sup>2</sup>, BRUN ET GRAU<sup>3</sup>, BACHUR<sup>4</sup>, KUNKEE<sup>5</sup>; selon cette dernière technique certains auteurs tels que COOKE<sup>6</sup>, LINDNER ET JURICS<sup>7</sup>, ont cherché la possibilité d'évaluation quantitative par photodensitométrie. Dans cette voie nous avons obtenu une méthode convenant aux acides contenus dans les jus de raisin, les vins et les extraits végétaux.

---

\* Stagiaire de l'École Supérieure d'Agriculture de Purpan-Toulouse à la Station Centrale de Technologie des Produits Végétaux.

## SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

*Mode opératoire*

*Préparation des couches.* Les plaques (20 × 20 cm) sont préparées avec de la poudre de cellulose (Macherey, Nagel et Co. MN 300) et stockées dans une enceinte exempte de vapeur d'acide.

*Dépôt des solutions.* Les solutions à analyser sont déposées en bandes fines de 20 mm de longueur disposées à 2 cm du bord inférieur de la plaque.

Les vins rouges sont débarrassés préalablement des anthocyanes qui se superposent avec le spot de l'acide tartrique. Ils sont traités avec du charbon végétal à raison de 250 mg/10 ml ou avec une résine échangeuse de cations (type Dowex 50).

*Humidification et développement.* L'enceinte devant servir au développement est saturée de vapeur d'eau au moyen de deux béciers de 25 ml dans lesquels on verse une vingtaine de millilitres d'eau à 70°. Dix minutes après, on introduit deux plaques dans la cuve, la couche cellulosique tournée vers les béciers (vers l'intérieur). On referme et après deux heures d'humidification, on verse le solvant de développement constitué par la phase supérieure du mélange butanol-acide formique-eau (4:2:5), préparé depuis un mois.

*Révélation.* La révélation a fait l'objet de nombreux essais. Le mélange glucide-aniline a été préféré aux autres révélateurs (bleu de bromophénol, pyridine, 2',7'-dichlorofluoresceine); parmi les glucides, le *d*-arabinose donne les meilleurs résultats: fond uniforme et très clair, taches très contrastées. La pulvérisation du révélateur après développement s'est montrée supérieure aux autres types d'application (mélange à la suspension de cellulose avant étalement, mélange au solvant de développement, imbibition par les vapeurs).

On utilise le mélange suivant:

20 ml d'une solution aqueuse de *d*-arabinose (2 g dans 20 ml); 22 ml d'une solution alcoolique d'aniline (2 ml d'aniline récemment distillée dans 20 ml d'éthanol); 58 ml de *n*-butanol débarrassé de ses impuretés acides par agitation 2 h sur la soude (30 g de soude par litre de butanol) puis distillation.

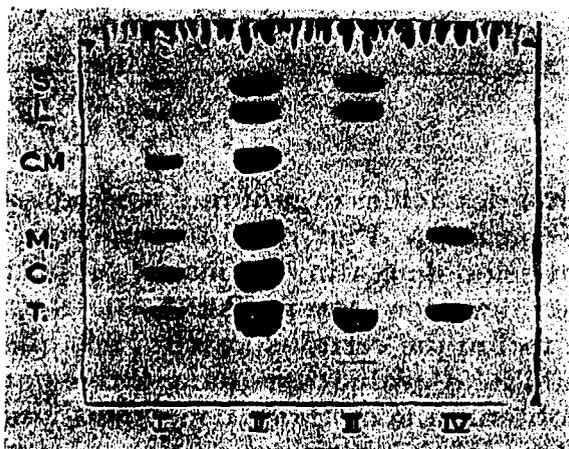


Fig. 1. T = Acide tartrique; C = Acide citrique; M = Acide malique; C.M. = Acide citramalique; L = Acide lactique; S = Acide succinique. I = Solution-témoin (10 méquiv. de chaque acide par litre); II = Solution-témoin (50 méquiv. de chaque acide par litre); III = Vin rouge de carignan 1967; IV = Jus de raisin rouge 1968.

Ce mélange doit être conservé à basse température et à l'abri de la lumière. Il est pulvérisé sur les plaques posées horizontalement à raison de 10–12 ml sur chacune. Les plaques sont mises dans une étuve à 90° bien ventilée et obscure, pendant 6 min puis elles sont placées dans une enceinte, à l'abri des vapeurs d'acide.

Le lendemain, la révélation est d'une netteté suffisante.

### Résultats

La Fig. 1 reproduit un chromatogramme de quatre échantillons. On notera l'efficacité de la séparation et la netteté du contour des taches. On observe les échantillons suivants:

Échantillon No. 1: 20  $\mu$ l d'une solution aqueuse d'acides organiques à 10 méquiv./l chacun; échantillon No. 2: 20  $\mu$ l d'une solution aqueuse d'acides organiques à 50 méquiv./l chacun; échantillon No. 3: 20  $\mu$ l d'un vin rouge de carignan. Macération de sept jours (chromatographie après décoloration); échantillon No. 4: 20  $\mu$ l d'un jus de raisin rouge sulfité puis désulfité. (Chromatographie après dilution dans 3 volumes d'eau).

Les  $R_F$  des différents acides sont recueillis dans la Tableau I.

TABLEAU I

VALEURS DES  $R_F$  DES PRINCIPAUX ACIDES CONTENUS DANS LES VINS, LES JUS DE RAISIN ET LES EXTRAITS VÉGÉTAUX

Acide	$R_F$
Tartrique	0.13
Citrique	0.23
Malique	0.34
Citramalique	0.55
Lactique	0.69
Succinique	0.79

### Discussion

L'étalement important des différents  $R_F$  assure une bonne efficacité à la séparation. Celle-ci est encore améliorée par le fait que l'acide tartrique, généralement le plus important, est celui qui migre le moins. On peut souligner d'autre part la netteté des taches de  $R_F$  élevé (acides citramalique, lactique et succinique) difficile à obtenir avec d'autres méthodes.

Un acide organique donné et ses différents sels sont isolés au sein d'une même tache chromatographique. Nous reviendrons sur cette intéressante particularité dans la partie quantitative.

Sur les chromatogrammes réalisés à partir d'une solution d'acide lactique, celui-ci donne naissance à deux taches, une principale de  $R_F = 0.69$  due à l'acide lui-même et une plus réduite de  $R_F = 0.86$  due vraisemblablement à un lactide (résultat de l'estérification réciproque des fonctions alcool et acide de deux molécules). Pour éviter cet inconvénient on peut procéder à partir d'une solution de lactate de sodium.

Par ailleurs, il y a une tendance inexplicée de l'acide tartrique à donner deux taches contigües, lorsque les doses de départ sont élevées (1 microéquivalent).

Nous avons envisagé le devenir de quelques acides exogènes (antiseptiques

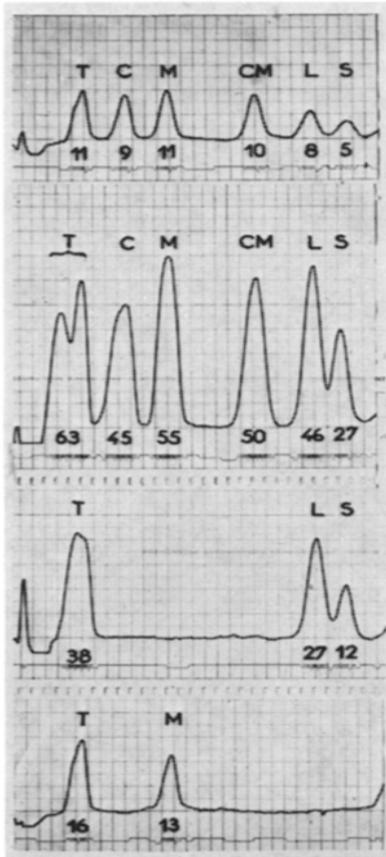


Fig. 2. I = Solution-témoin (10 méquiv. de chaque acide par litre); II = Solution témoin (50 méquiv. de chaque acide par litre); III = Vin rouge de carignan 1967; IV = Jus de raisin rouge 1968. Le chiffre en dessous de chaque pic correspond au nombre de "tops".

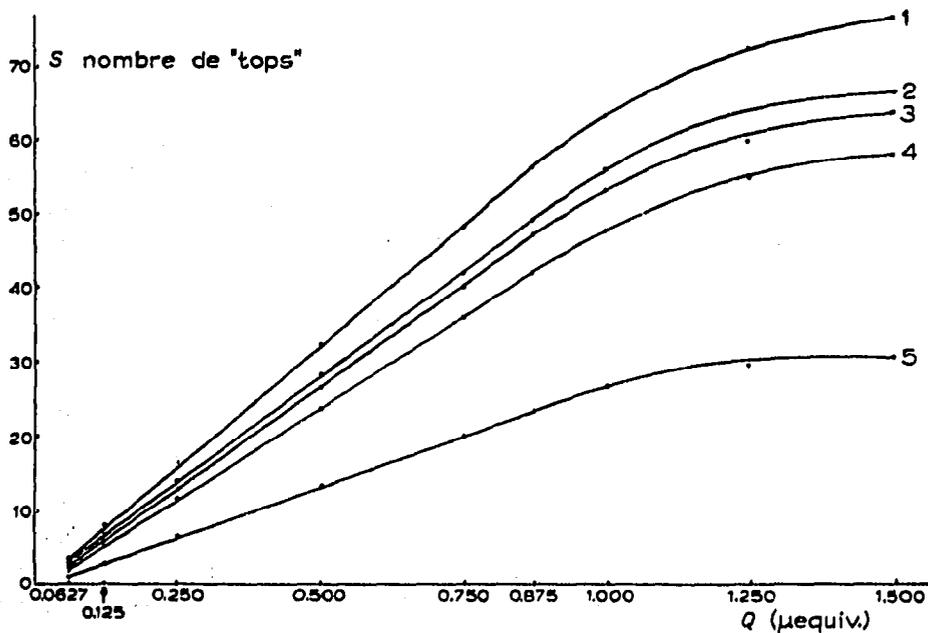


Fig. 3. Relation entre la surface d'un pic et la quantité d'acide déposée. (1) = acide tartrique; (2) = acide malique; (3) = acide citrique; (4) = acide lactique; (5) = acide succinique.

TABLEAU II

VALEURS DES  $R_F$  DE QUELQUES ACIDES GÉNÉRALEMENT PRÉSENTS À L'ÉTAT DE TRACES

<i>Acide</i>	$R_F$	<i>Acide</i>	$R_F$
Benzoïque	0.03	Galacturonique	0.02
Cyanhydrique	0.04	Gluconique	0.44
Salicylique	0.00	Glutamique	0.04
Sorbique	0.00	Glucuronique	0.13
Sulfureux	0.03	Malonique	0.61
$\alpha$ -Cétoglutarique	0.55	Oxalique	0.06
Chlorhydrique	0.05	Phosphorique	0.06
Diméthylglycérique	0.64	Shikimique	0.20
		Sulfurique	0.00

autorisés ou frauduleux) ou naturels qui, généralement présents à l'état de traces, peuvent prendre exceptionnellement une certaine importance. Les  $R_F$  de ces acides sont recueillis dans le Tableau II.

La plupart de ces acides ne migrent pas ou migrent très peu et de ce fait ne peuvent interférer. Ceux qui migrent sont généralement présents dans les vins à l'état de traces non révélables. Il convient toutefois d'être prudent avec les vins issus de vendanges botrytisées ou eudémisées car la teneur en acide glucuronique peut ne plus être négligeable et la tache brune correspondante chevauche alors celle de l'acide tartrique.

#### ÉVALUATION PHOTODENSITOMETRIQUE

##### *Mode opératoire*

Les mesures sont effectuées à l'aide du Photomètre intégrateur enregistreur Vernon\* type T.R.D. 5, (un photodensitomètre Joyce-Loebl, type Chromoscan\*\* a également été utilisé). Ces appareils sont employés en transparence. La longueur du faisceau lumineux est supérieure de quelques fractions de millimètres à celle des taches.

Afin d'augmenter le contraste, un filtre Wratten (47 B) est placé entre la plaque chromatographique et la cellule photoélectrique.

La surface de chaque pic est intégrée en unités arbitraires, au moyen de "tops" successifs inscrits au bas de la feuille d'enregistrement (Fig. 2).

La Fig. 3 montre que la surface d'un pic (intégrale de la densité optique des différents points de la tache correspondante), est proportionnelle à la quantité d'acide déposée jusqu'à un microéquivalent; au delà de cette dose, la relation n'est plus linéaire.

Pour un même dépôt c'est le composé obtenu par la révélation de l'acide tartrique qui a le coefficient d'extinction moléculaire le plus important, celui obtenu par la révélation de l'acide succinique étant le plus faible.

Sur une même plaque de 20 x 20 cm, on dépose cinq taches selon une bande de deux centimètres de longueur :

\* Fabriqué par les Établissements Vernon, 5, rue Ed. Temblay 94, Vitry sur Seine.

\*\* Joyce-Loebl, France, 84, rue de Verdun, 75, Suresnes.

Solution étalon: 0.2 microéquivalent de chaque acide; solution étalon: 1.0 microéquivalent de chaque acide; trois échantillons à analyser.

Les doses de 0.2 et 1.0 microéquivalent sont à l'intérieur des limites où l'évaluation photodensitométrique reste linéaire. Le recours à deux mélanges synthétiques de concentrations voisines des extrêmes est rendu obligatoire par la variabilité de la révélation.

### Résultats et discussion

*Précision des résultats.* Les causes d'erreurs en photodensitométrie ont été envisagées dans une étude générale de SHELLARD<sup>8</sup>.

Les évaluations réalisées à partir de chromatographie sur papier ou sur couche mince peuvent être entachées d'une erreur dont la principale est due à l'impossibilité du transfert sur le support de la totalité du volume choisi.

Les recherches de FAIRBAIRN ET RELPH<sup>9</sup> montrent que l'ascension du liquide sur la paroi extérieure de la pipette, et la capillarité à l'intérieur, conduisent à des erreurs sur le volume déposé. Ces erreurs sont estimées plus importantes que celles dues à toutes les autres opérations réunies. Les auteurs concluent à la nécessité d'effectuer les dépôts au moyen d'un "dispositif à éjection forcée de gouttes". Dans le présent travail, cette technique n'a pas été employée.

Parmi les autres causes d'erreurs, le mode d'application et la variation du volume de révélateur utilisé ne paraissent pas intervenir, le volume choisi étant en large excès. Par contre, le chauffage fait parfois apparaître une hétérogénéité du fond près des bords latéraux. En conséquence, il est préférable de ne pas effectuer de dépôt à moins de 3 cm de ceux-ci.

TABLEAU III

PRÉCISION DES RÉSULTATS DES DÉTERMINATIONS DES TENEURS INDIVIDUELLES EN ACIDE TARTRIQUE ET MALIQUE D'UN JUS DE RAISIN (méquiv./l)

Dosages	Acide tartrique	Acide malique
1	69.6	23.6
2	67.8	22.5
3	65.7	21.8
4	66.3	22.2
5	68.4	22.7
6	67.8	22.1
7	69.3	23.4
8	67.5	22.6
9	68.1	22.8
10	69.0	22.5
11	67.5	23.2
12	64.8	21.4
Moyenne arithmétique	67.65	22.56
Écart type d'une mesure	1.442	0.642
Erreur d'une mesure ( $P = 0.05$ )	3.17	1.41
Erreur relative d'une mesure	$\pm 4.70\%$	$\pm 6.26\%$
Écart type de la moyenne (erreur-type)	0.416	0.185
Erreur de la moyenne ( $P = 0.05$ )	0.915	0.407
Erreur relative de la moyenne	$\pm 1.35\%$	$\pm 1.80\%$

TABLEAU IV

DÉTERMINATION PHOTODENSITOMÉTRIQUE APRÈS ADDITION D'UNE QUANTITÉ CONNUE D'ACIDES TARTRIQUE ET SUCCINIQUE À UN VIN BLANC

Acide	Avant addition		Après addition de 10 méquiv./l	
Tartrique	31		41	
Succinique	9		18	

A partir d'un même échantillon nous avons fait douze déterminations complètes des teneurs en acide tartrique et malique. Les résultats obtenus et l'étude de leur variabilité figurent dans le Tableau III.

Une étude analogue sur un vin montre que les résultats concernant les teneurs en acide succinique et lactique peuvent être évaluées avec une précision de l'ordre de celle qui est obtenue pour l'acide malique.

L'addition d'une quantité connue (10 méquiv./l) d'acides tartrique et succinique à un vin blanc se retrouve lors de la détermination photodensitométrique ainsi que le confirme le Tableau IV.

*Évolution des taches en fonction du temps.* Comme cela a été signalé dans la première partie, après pulvérisation et chauffage, il convient d'attendre le lendemain pour procéder aux déterminations photodensitométriques. En effet, aussitôt après le chauffage, les taches sont de très faible intensité et rougeâtres. Après quinze à vingt heures d'attente, l'intensité a fortement augmenté et la teinte a viré au brun rougeâtre. Ce délai nous paraît être suffisant.

En fait, même après une vingtaine d'heures d'attente il y a encore une évolution de la teinte vers le brun et également une légère augmentation du contraste.

L'évolution des taches témoins étant la même que celle des taches correspondant aux vins et aux jus de raisins, les résultats sont sensiblement les mêmes si on fait la détermination photométrique le surlendemain au lieu du lendemain.

Ce fait confirmé par les résultats mentionnés dans le Tableau V, accroît la commodité d'utilisation de la méthode.

TABLEAU V

RÉSULTATS DES DÉTERMINATIONS PHOTODENSITOMÉTRIQUES EFFECTUÉES 24 h OU 40 h APRÈS LA RÉVÉLATION (méquiv./l)

Détermination	Acide tartrique		Acide malique		Acide lactique		Acide succinique	
	24 h	40 h	24 h	40 h	24 h	40 h	24 h	40 h
<i>Vin de carignan rouge</i>								
No. 1	24.0	25.0			22.0	22.0	20	21.0
No. 2	22	21.6			22.0	21.7	19.5	19.2
No. 5	23.6	23.5			21.0	21.0	21.5	21.4
No. 7	25.0	24.0			23.0	22.5	23.0	22.7
<i>Jus de raisin rouge</i>								
No. 1	44.0	46.0	45.2	44.0				
No. 5	50.0	48.0	48.0	48.4				

TABLEAU VI

SURFACE DES PICS (NOMBRE DE "TOPS") OBTENUS À PARTIR DE DÉPÔTS DE 0.8  $\mu$ équiv. D'ACIDE TARTRIQUE LIBRE ET DE TARTRATES ACIDE ET NEUTRE DE POTASSIUM)

<i>Acide tartrique</i>	<i>Tartrate acide de potassium</i>	<i>Tartrate neutre de potassium</i>
46	46	44

*Influence éventuelle de la salification.* Les manipulations précédentes ont été réalisées avec des acides libres. La méthode étant destinée aux moûts et aux vins, il était important de savoir si ceux-ci devaient être préalablement décationisés ou non.

Nous avons pu observer que la chromatographie d'un acide libre et de un ou plusieurs de ses sels, donne une tache unique. De plus l'addition d'acide sulfurique à un échantillon ne modifie pas les résultats quantitatifs obtenus. Enfin, le Tableau VI montre que la surface des pics est la même pour un même nombre d'équivalents, que l'acide soit libre, partiellement ou totalement salifié.

#### CONCLUSION

La méthode d'isolement et de révélation établie, conduit à une bonne séparation des acides organiques libres et salifiés, des jus de raisin et des vins. Les acides tartrique, citrique, malique, citramalique, lactique et succinique et leurs sels donnent des taches nettes, bien isolées. Il en est de même pour d'autres acides moins importants en oenologie, tel que les acides gluconique, diméthylglycérique, shikimique.

Sur la base de ces résultats, il apparaît que la méthode photodensitométrique permet de déterminer rapidement les teneurs individuelles en acides organiques libres ou salifiés des jus de raisin et des vins. La précision des résultats est suffisante pour convenir non seulement aux laboratoires d'analyses courantes mais aussi aux laboratoires de recherches. On peut envisager d'étendre le champ d'application de cette méthode à d'autres domaines que l'oenologie, en biochimie végétale notamment.

#### RÉSUMÉ

Les acides tartrique, malique, lactique, succinique, citrique et citramalique sont identifiés après séparation par chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de cellulose. Les teneurs individuelles sont évaluées par photodensitométrie des taches.

La méthode est applicable aux acides libres ou salifiés contenus dans les vins, les jus de raisins ou les extraits végétaux.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. CARLES, A. SCHNEIDER ET A. M. LACOSTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 221.
- 2 H. RASMUSSEN, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 512.
- 3 S. BRUN ET C. GRAU, *Trav. Soc. Pharm. Montpellier*, 17 (1967) 75.
- 4 N. R. BACHUR, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 463.

- 5 R. E. KUNKEE, *Wines and Vines*, 49 (1968) 23.
- 6 G. M. COOKE, *Qualitative or semi-quantitative determination of tartaric, citric, and malic acids by paper chromatography*, University of California Agricultural Extension Service, 1961.
- 7 K. LINDNER ET E. W. JURICS, *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.*, 128 (1965) 65.
- 8 E. J. SHELLARD, *Quantitative paper and thin-layer chromatography*, Academic Press, London, 1968.
- 9 J. W. FAIRBAIRN ET S. J. RELPH, *J. Chromatog.*, 33 (1968) 494.

*J. Chromatog.*, 50 (1970) 83-91