
BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

Quelques variantes pour le titrage de la vitamine C

par Danièle PETITFAUX
Lycée Roosevelt - 51100 Reims
et Christian PETITFAUX
UFR des Sciences Exactes et Naturelles
Moulin de la Housse - BP 1039
51687 Reims Cedex 2

RÉSUMÉ

Plusieurs méthodes de titrage de la vitamine C directes ou après une étape de substitution sont décrites. Choisies à cause de leur simplicité elles exploitent soit des réactions d'oxydoréduction soit la formation de complexes colorés. Les résultats obtenus sont systématiquement comparés à la valeur attendue, elles donnent toutes une précision globalement acceptable.

Le titrage de la vitamine C dans différents milieux (médicament, jus d'orange, etc.) est devenu un thème de manipulation très courant au lycée [1]. En plus des méthodes iodométrique et photométrique habituelles, il est possible de recenser de nombreuses autres techniques plus ou moins sophistiquées. Parmi toutes celles-ci nous avons choisi celles réalisables avec le matériel courant que l'on trouve dans l'enseignement secondaire (potentiomètre, colorimètre voire conductimètre). Ce choix nous conduit à éliminer d'autres techniques plus sophistiquées telles que la polarographie ou la chromatographie.

Ces méthodes sont regroupées dans la figure 1. Elles concernent soit seulement l'une des formes acide ou base soit globalement l'ensemble de ces deux formes réduites par titrage direct ou après substitution par exemple en cuivre I ou mieux en acide déhydroascorbique Co forme oxydée de la vitamine C.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

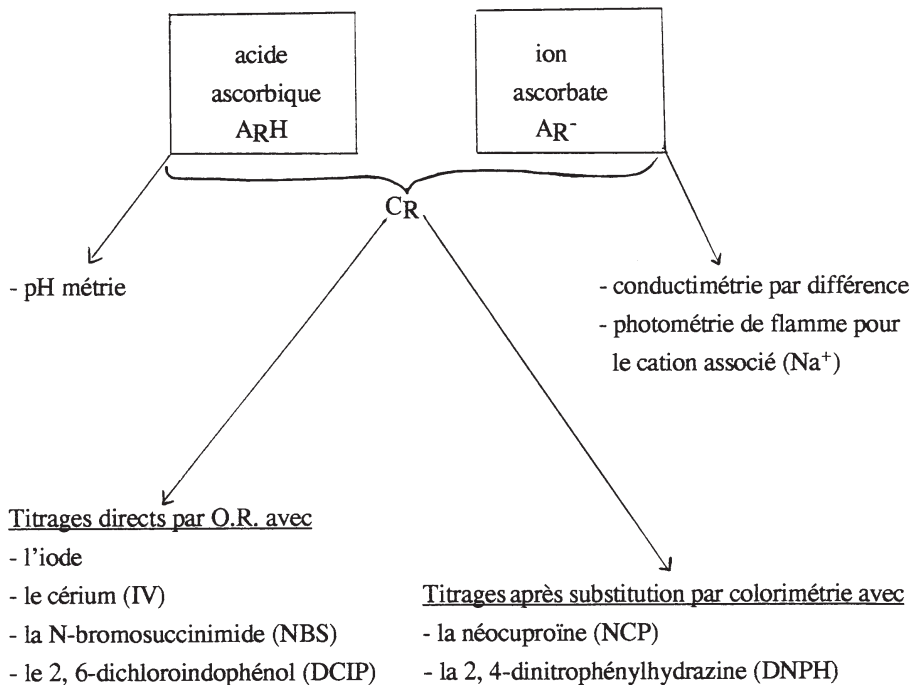
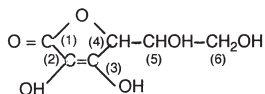
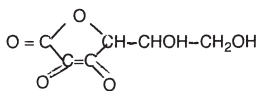


Figure 1 : Méthodes choisies.

 BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

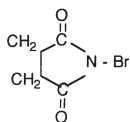
FORMULES DES RÉACTIFS ET SYMBOLES UTILISÉS¹


Formule de l'acide ascorbique (dont la vitamine C est la forme L) présente en milieu acide et symbolisée A_RH . Le proton ionisable est celui de la fonction éinol du carbone 3 (pour A_RH / A_R^- $pK_a = 4,04$). La somme des concentrations des espèces réduites sera symbolisée $.C_R$



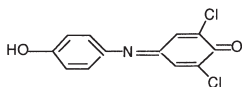
Forme oxydée appelée acide déhydroascorbique et symbolisée Co

(pour $Co + 2e^- \rightleftharpoons C_R$ $E = 0,13$ Volts à $pH = 0$).



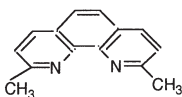
N-Bromosuccinimide (NBS)

($C^* = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$).



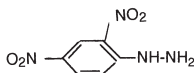
2,6-dichloroindophénol (DCIP)

($C^* = 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ à partir du sel de sodium).



2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline ou néocuproïne (NCP)

($C^* = 0,25 \text{ g.L}^{-1}$).



2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH)

($C^* = 20 \text{ g.L}^{-1}$ en milieu H_2SO_4 dilué 1/4).

C^* : Concentration de la solution-mère utilisée lors de cette étude.

1. L'ordre de grandeur des prix du gramme donné à titre indicatif est :
NBS : 10 F. ; DCIP : 25 F. ; NCP : 50 F. et DNPH : 4 F.

 BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

Il s'agit de cachets de VITASCORBOL 500 tamponné couramment disponibles en pharmacie. Chaque cachet contient 247,2 mg d'acide ascorbique et 284,4 mg de son sel de sodium soit l'équivalent de :

$$247,2 + \frac{284,4 \times 176,13}{198,12} = 500 \text{ mg d'acide}$$

ce qui correspond à $2,84 \cdot 10^{-3}$ mole.

La masse moyenne de chaque cachet est de l'ordre de $1,995 \pm 0,020$ g. L'excipient est principalement constitué de sucre pulvérisé². En outre d'autres substances plus spécifiques, variables selon les fabricants ont été ajoutées (pour obtenir un goût d'orange par exemple). Notre étude réalisée avec des cachets de deux origines différentes (Rhône-Poulenc et Midy-Lafarge) n'a pas révélé d'influence significative des excipients sur les résultats des titrages.

Les solutions à titrer (solution S) correspondent toujours à un cachet dissous dans 100 cm^3 d'eau distillée. Bien que l'addition d'un acide réducteur tel que l'acide oxalique combinée à une conservation au frigo retardent très sensiblement l'oxydation [2], nous avons préféré refaire cette solution chaque demi-journée. Enfin la présence d'un léger trouble n'a apparemment pas d'incidence mais de toutes façons semble bien difficile à éliminer.

TITRAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE SEUL (A_RH)

C'est le plus simple, il est effectué par la soude soit avec un pH-mètre soit en présence de rouge de crésol donc la zone de virage s'étend de pH = 7,2 à pH = 8,8.

La précision obtenue est couramment meilleure que 1 % ce qui n'incite pas à rechercher d'autres méthodes de titrage de cette espèce.

TITRAGE DES IONS ASCORBATE SEULS (A_R^-)

La valeur de la constante d'acido-basicité correspondante ($pK_a = 4,04$) exclut un titrage pH métrique directement par un acide mais également un titrage par différence,

2. Il existe également une présentation «sans sucre» la composition est alors de 200,0 mg de forme acide pour 337,5 mg du sel de sodium.

 BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

plusieurs essais ont montré qu'il y a alors interférence entre la neutralisation de l'acide fort excédentaire et celle de l'acide ascorbique.

En revanche, un titrage conductimétrique de préférence par différence de l'espèce A_R^- et un titrage par photométrie de flamme du cation associé Na^+ donnent des résultats plus satisfaisants.

Titration conductimétrique

La figure 2 représente la variation de la conductance G mesurée lors du titrage d'une prise d'essai de 10 cm^3 de solution S additionnée de 12 cm^3 d'une solution d'acide chlorhydrique $0,0211\text{ mol.L}^{-1}$ par de la soude exactement $0,0202\text{ mol.L}^{-1}$.

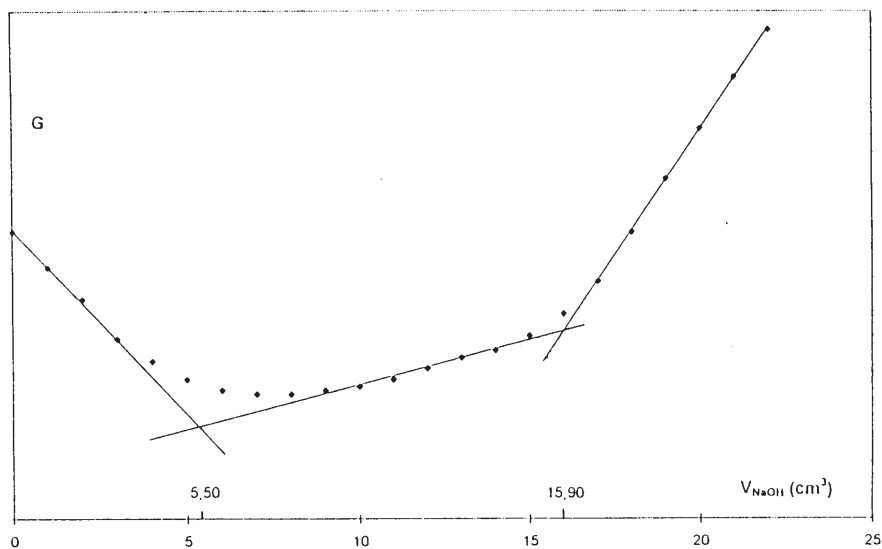


Figure 2

L'abscisse de la première cassure observée pour $5,5\text{ cm}^3$ versés conduit à $1,421 \cdot 10^{-4}$ moles d'ions ascorbate présents dans la prise d'essai soit $281,5\text{ mg}$ d'ascorbate de sodium dans le cachet, valeur proche de la masse attendue.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

La seconde cassure bien que nettement visible n'est pas numériquement exploitable. Elle conduit à un important déficit en vitamine C de l'ordre de 25 %. Cette anomalie n'a pas pu être totalement éliminée malgré de nombreux essais portant sur la température des solutions et la fraîcheur des réactifs. Peut-être provient-elle au moins en partie de l'excipient ?

Titrage photométrique des ions Na^+ **Principe**

L'énergie d'une flamme chaude est suffisante pour produire l'excitation des métaux alcalins et alcalino-terreux lesquels émettent alors des radiations caractéristiques de chacun d'eux. Cette émission et la relation entre l'intensité de la radiation et la concentration de l'élément concerné sont les bases de la photométrie de flamme. C'est une méthode précise et rapide particulièrement intéressante pour les métaux alcalins dont les méthodes de titrages sont assez peu nombreuses.

Conditions expérimentales et résultats

La température de la flamme air - butane est suffisante pour observer la raie du sodium à 589 nm. L'étalonnage a été réalisé avec des solutions de NaCl contenant de $4,32 \cdot 10^{-4}$ à $2,16 \cdot 10^{-3}$ mole de sel dans 100 cm^3 . La simple mesure de la déviation pour la solution S donne alors par interpolation graphique directement le nombre de moles d'ions Na^+ par cachet soit ici $1,45 \cdot 10^{-3}$ mole. Ce nombre conduit à 287,3 mg d'ascorbate de sodium par cachet en bon accord avec la valeur théorique ce qui permet d'affirmer «a posteriori» l'absence dans l'excipient d'ions sodium en quantité significative, condition indispensable pour que cette méthode soit utilisable³.

TITRAGES DIRECTS DE LA VITAMINE C

Ils consistent à oxyder les deux formes acido-basiques conjuguées A_RH et A_R^- en acide dehydroascorbique Co. Les différents oxydants testés sont rassemblés dans le tableau 1.

3. Indirectement on peut prévoir également l'absence d'ions Ca^{2+} en grande quantité, ce qui aurait perturbé ce titrage.

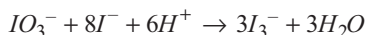
 BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

Méthode de titrage	Iodométrie	Ce ^{IV}	«Nbromo-» succinimide	Dichloroindophénol	
				pH = 4,5	pH = 6,8
Indicateur ajouté	Empois d'amidon	Diphénylamine sulfonate de baryum	KI en présence d'empois d'amidon		
Changement de couleur à l'équivalence	Incolore à bleu	Incolore à mauve	Incolore à bleu	Incolore à rose pale	Incolore à bleu pâle
Qualité du virage	Net	Net	Net	Médiocre	Moyen
Écart relatif par rapport à la valeur attendue	0,3 %	0,7 %	1,3 %	2,7 %	3,3 %

Tableau 1 : Titrages directs par O-R.

L'équivalence a été mise en évidence par changement de couleur mais des titrages potentiométriques sont évidemment réalisables (en particulier pour des milieux complexes contenant d'autres espèces colorées). Parmi les commentaires spécifiques à chacune de ces variantes on peut indiquer :

- Pour l'iodométrie : Ce titrage est réalisable directement (solution d'iode dans la burette) mais est plus précis en opérant par différence : addition d'un excès d'iode connu et neutralisation par une solution d'ions $S_2O_3^{2-}$ (le changement de couleur indiqué dans le tableau 1 est relatif au titrage direct). Enfin une autre variante envisageable est la formation d'iode «in situ» selon la réaction :



qui permet de maintenir la solution à titrer en milieu fortement acide [3].

- Avec le cérium (IV) : La solution de réactif a été obtenue par dissolution en milieu acide sulfurique (pH de l'ordre de 1) d'une quantité calculée de sulfate de cérium IV supposé trihydraté. Elle a dû être préalablement étalonnée par une solution de sel de Mohr, le sulfate de cérium s'étant sensiblement humidifié.

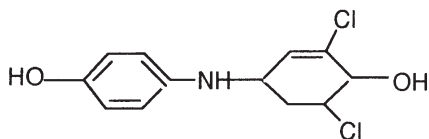
- Avec la N-bromosuccinimide (NBS) : Les solutions de ce produit ne sont pas stables, elles s'oxydent facilement et en particulier à la lumière. Il est indispensable de les retirer avec une solution d'acide ascorbique de référence.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

La réaction d'oxydoréduction s'effectue mole à mole, la réduction de la NBS consommant deux électrons avec formation de succinimide et d'acide bromhydrique.

Enfin le couple I_2 / I^- est utilisable comme indicateur de fin de réaction car les ions iode sont moins réducteurs que l'acide ascorbique.

• Avec le 2,6-dichloroindophénol (DCIP) : Ce composé coloré réduit en consommant deux électrons en un leucodérivé incolore de formule :



peut servir d'auto-indicateur. Cependant la couleur du DCIP ajouté en excès varie avec le pH comme le montrent les spectres d'absorption de la figure 3. Il y a passage du rouge au bleu lorsque le pH croît. Cette évolution est due à l'ionisation progressive de la fonction phénol. Elle oblige à fixer le pH de la solution. Pour choisir des solutions tampon convenables, la constante d'acido-basicité correspondante a été déduite des spectres de la figure 3. Le tableau 2 conduit à une valeur moyenne : $pK_a = 6,05$.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

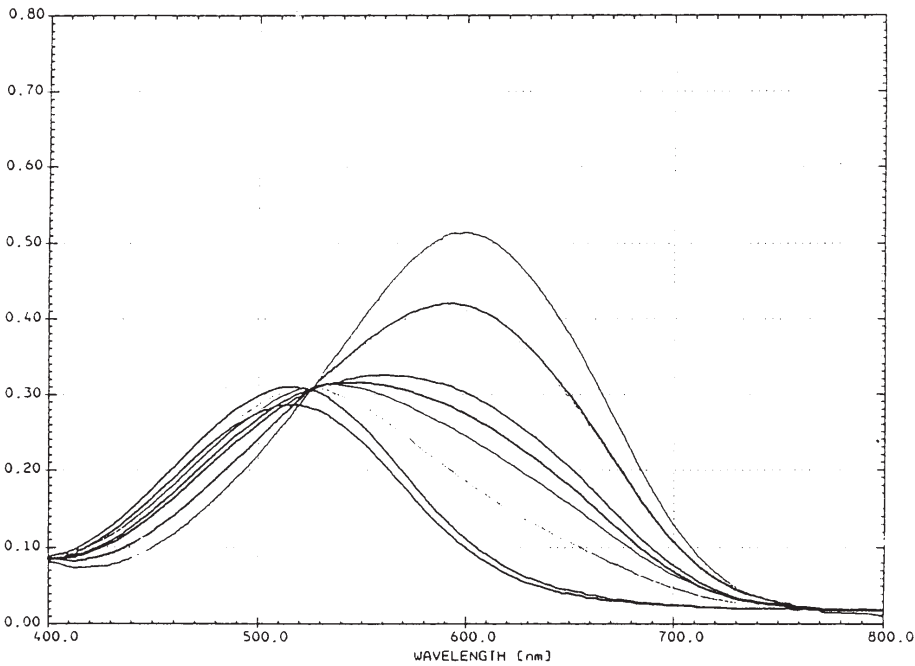


Figure 3 : Spectres d'absorption d'une solution de DCIP à différents pH (la longueur d'onde du point isobestique est de 525 nm).

pH	5,33	5,46	5,93	6,20	6,63
ABS	0,150	0,175	0,270	0,320	0,415
pKa	6,06	6,02	6,03	6,10	6,07

Tableau 2 : Constante d'acido-basacité du DCIP $\left(\lambda = 600 \text{ nm} \text{ et } pK_a = pH + \log \frac{0,505 - ABS}{ABS - 0,085} \right)$.

Aux deux pH retenus : 4,5 et 6,8 obtenus avec des tampons phosphate appropriés l'équivalence devient visualisable mais la précision reste inférieure à celle obtenue avec les trois autres méthodes.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

Généralisation de ces titrages par O-R

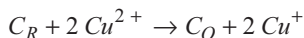
Même en contrôlant la qualité du virage et la stabilité des solutions et indicateurs elles ne sont pas systématiquement utilisables pour titrer la vitamine C dans des milieux plus complexes. En particulier la présence d'autres réducteurs peut être fort gênante ainsi nos essais de titrage de barres de suppléments multivitamines ont échoué à cause de la présence d'ions fer(II).

TITRAGES APRÈS UNE RÉACTION DE SUBSTITUTION

Pour échapper à la relative instabilité des solutions aqueuses de vitamine C, il est tentant d'utiliser une réaction de substitution qui consiste à former rapidement un autre composé plus stable et si possible facile à titrer. Parmi de nombreuses possibilités deux exemples sont ici successivement décrits, ils ont été choisis à cause de leur bonne précision mais aussi de la possibilité d'utiliser une méthode colorimétrique.

Titration par la néocuproïne

La réaction de substitution est :



les ions cuivre(I) sont ensuite dosés par colorimétrie après formation d'un complexe coloré avec la néocuproïne (NCP) selon le protocole établi par BAKER et LOWE [4].

Résultats obtenus

Cette méthode demande d'opérer en milieu relativement dilué. La droite d'étalonnage présentée figure 4 correspond à une concentration en acide ascorbique (de qualité normapur) variant de 39 à 195 mg. L⁻¹. La valeur interpolée pour la solution inconnue conduit en tenant compte des dilutions à un nombre de moles d'acide ascorbique dans un cachet qui diffère seulement de 0,8 % de la valeur attendue.

 BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

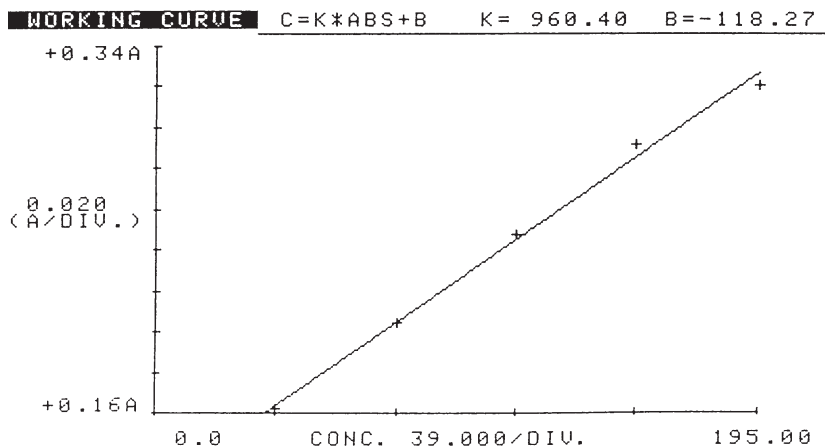


Figure 4 : Droite d'étalonnage pour le titrage colorimétrique avec la néocuproïne ($\lambda = 450$ nm, les concentrations sont données en mg.L^{-1}).

Conditions expérimentales

Pour obtenir un tel accord, il faut cependant respecter ou vérifier un certain nombre de conditions :

- d'abord s'assurer que la double inégalité exprimée en concentration $C_R < Cu^{2+} < NCP$ est bien satisfaite,
- ensuite préparer toutes les solutions dans les conditions optimales de stabilité : emploi systématique de l'eau distillée, addition d'acide pour stabiliser la solution de vitamine C, tampon aux phosphates de $\text{pH} = 7$ en milieu éthanol/eau 1/1 et en présence de sulfate de cuivre(II) pour préparer la solution de néocuproïne⁴.

Généralisation

Tous les composés aptent à réduire Cu^{2+} sont gênants, par contre la linéarité de l'étalonnage permet des mesures en série et une informatisation de leur exploitation.

4. La solution de néocuproïne ainsi préparée est stable plusieurs semaines mais ce mode de préparation entraîne une légère absorption du complexant qui devra être soustraite des mesures après un essai «à blanc».

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

Titration par la 2,4-dinitrophénylhydrazine

La réaction de substitution choisie ici consiste à favoriser l'oxydation de la vitamine C en acide déshydroascorbique C_O laquelle en présence de 2,4 diphénylhydrazine (DNPH) formera une osazone de couleur orangée donc titrable par colorimétrie : la bis (2,4-dinitrophényl)hydrazone résultant de la réaction de deux groupements carbonyle de C_O .

Recherche des bonnes conditions expérimentales

L'étape d'oxydation de l'acide ascorbique est la plus facile à effectuer. L'oxydant est généralement le DCPIP introduit en excès pour avoir une réaction totale. L'élimination de cet excès en exploitant la solubilité nettement plus grande dans l'acétate d'amy-le que dans l'eau est cependant une manipulation assez fastidieuse qui demande souvent plusieurs extractions.

La seconde étape est la formation de l'osazone. Elle a été longuement étudiée à la fois pour le choix du milieu, des conditions de pH et surtout de la température [5] [6]. Finalement nous avons choisi de chauffer au bain-marie à 40°C pendant trois heures.

L'osazone obtenue est insoluble en milieu acide sulfurique mais soluble dans l'acétate d'éthyle [7]. Il est alors possible de préparer dans ce solvant des solutions homogènes adaptées à des mesures d'absorbance.

Résultats obtenus

L'étalonnage a été réalisé avec des concentrations en acide ascorbique comprises après les dilutions successives entre 0,104 et 0,512 $mg.L^{-1}$. Les deux déterminations totalement indépendantes réalisées à partir de deux cachets différents conduisent respectivement à la valeur exacte à 0,6 et 1,2 % près. Malgré l'importance des manipulations à effectuer (dilutions et extraction) les résultats obtenus sont donc corrects.

Commentaires sur cette méthode

Les désagréments de la longueur des manipulations et de la durée de l'attente (trois heures) sont compensés par le bénéfice résultant de l'étape d'extraction par l'acétate d'éthyle. En effet, elle permet très souvent de s'affranchir de la présence d'autres composés colorés.

BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE – BUP PRATIQUE

Enfin, en combinant des titrages avec et sans l'étape initiale de substitution, il est possible théoriquement de connaître la quantité d'acide déshydroascorbique présente dans l'échantillon initial encore que l'acide 2,3-dicétogluconique résultant de l'hydrolyse du composé précédent forme aussi une hydrazone de couleur rouge-orangé.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les différentes méthodes relativement simples décrites dans cette étude conduisent généralement à des résultats corrects. Cependant, il ne s'agit que d'une sélection assez arbitraire, de nombreuses autres techniques peuvent être envisagées.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Annales des olympiades nationales de la chimie, 1990, p. 119 puis livres d'enseignement de spécialité de la classe de terminales S.
- [2] T. HELSER - Chem. Educ., 72, p. A-10 (1995).
- [3] V. KUMAR, P. COURIE et S. HALEY - Chem. Educ., 69, p. A-213 (1992).
- [4] W. BAKER et R. LOWE - Analyst., 110, p. 1181 (1985).
- [5] R. SCHAFFERT et G.J. KINGSLEY - Biol. Chem., 212, p. 59 (1955).
- [6] J. ROE - Ann. N.Y. Acad. Sc., 92, p. 277 (1961).
- [7] L. MAPSON - Ann. N.Y. Acad. Sc., 92, p. 284 (1961).