

## Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol, composé à forte odeur de buis, intervenant dans l'arôme des vins de Sauvignon

par

T. TOMINAGA, P. DARRIET et D. DUBOURDIEU

Faculté d'Œnologie de l'Université de Bordeaux II, Talence, France

**Résumé :** L'extraction sélective des thiols volatils présents dans un vin à l'état de traces, associée à l'analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse (CPG)-détecteur à photométrie de flamme (DPF) et CPG-spectrométrie de masse (SM) de l'extrait obtenu, a permis d'identifier un nouveau constituant de l'arôme des vins de Sauvignon, l'acétate de 3-mercaptohexanol, jusqu'ici seulement caractérisé dans le fruit de la passion. Le seuil de perception dans l'eau et en solution modèle de ce composé fortement odorant évoquant le buis avec des nuances plus fruitées de pamplemousse et de fruit de la passion est de l'ordre de quelques ng/l. L'acétate de 3-mercaptohexanol pourrait contribuer significativement à l'arôme variétal des vins de Sauvignon.

### Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor

**S u m m a r y :** Selective extraction of volatile mercaptans present in wines at trace levels, combined with capillary gas chromatographic (GC) analysis using flame photometric detector (FPD) revealed the presence of a previously unreported compound in Sauvignon wine. 3-mercaptohexylacetate was identified by comparison of chromatographic and mass spectrum data with those of the reference compound. This mercapto ester, recently found in passion-fruit, exhibits aroma reminiscent of box tree with grapefruit and passion fruit notes. Its perception threshold in water and model solution is around 2-4 ng/l. 3-mercaptohexylacetate may contribute to the typical varietal aroma of Sauvignon wines.

**K e y w o r d s :** aroma, wine, Sauvignon grape, thiols, *p*-hydroxymercuribenzoate, 3-mercaptohexylacetate.

#### Introduction

Les vins de Sauvignon possèdent des arômes caractéristiques souvent intenses, dont les principaux descripteurs sont le poivron vert, le buis, le bourgeon de cassis, le pamplemousse, le fruit de la passion et dans certains cas la fumée. L'odeur de poivron vert est due à la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine initialement mise en évidence dans le Cabernet Sauvignon par BAYONOVE *et al.* (1975), puis identifié dans le Sauvignon blanc lui-même par AUGUSTYN *et al.* (1982). Ce composé dosé pour la première fois dans ces cépages par ALLEN *et al.* (1991, 1994), existe déjà dans le raisin et dans le moût non fermenté. Les autres caractères odorants bien que spécifiques du cépage, sont peu marqués dans le moût et se développent essentiellement au cours de la fermentation alcoolique (PEYNAUD 1980).

De précédents travaux (DARRIET 1993; DUBOURDIEU et DARRIET 1993; DARRIET *et al.* 1991, 1993, 1995) avaient clairement démontré la contribution d'au moins deux composés possédant une fonction thiol à l'arôme de buis des vins de Sauvignon et identifié l'un des deux à la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. Le dosage de cette mercapto-cétone présente dans certains vins de Sauvignon à des teneurs très supérieures à son seuil de perception (BOUCHILLOUX *et al.* 1996) a permis de confirmer son rôle organoleptique déterminant dans les vins «typés» de ce cépage.

Le présent travail concerne le deuxième composé soufré participant à l'odeur de buis des vins de Sauvignon; il rapporte son identification par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG-SM) rendue possible grâce à la mise au point d'une méthode d'extraction spécifique des thiols volatils présents à l'état de trace dans les vins.

#### Matériels et méthodes

**R é a c t i f s :** La cystéine-HCl anhydre est fournie par FLUKA (Code: 30199), le sodium *p*-hydroxymercuribenzoate (*p*-HMB) par SIGMA (Code: H0642), le dichlorométhane (qualités Atrasol et Pestipur) par SDS (Code: 02932E et 02922E). Le standard de l'acétate de 3-mercaptohexanol est obtenu chez INTERCHIM (F03103, Montlucan).

**Méthode d'extraction spécifique des thiols volatils d'un vin :** Un volume de 1,5 l de vin (Sauvignon blanc de Bordeaux, récolte 1995) ramené à pH 8,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium (10 N), est extrait dans une fiole de 2 l successivement par 2 fois 150 ml de dichlorométhane (Pestipur) pendant 5 min sous agitation magnétique. Les phases organiques rassemblées sont centrifugées pendant 5 min à 3.800 g pour casser l'émulsion et séparées dans une ampoule à décanter. La phase organique est ensuite extraite pendant 10 min suc-

cessivement par 2 fois 30 ml d'une solution de *p*-HMB (1 mM dans de l'hydroxyde de sodium 0,01 N). Les 2 phases aqueuses, séparées dans une ampoule à décanter, sont regroupées, ramenées à pH 7,3 avec une solution à 10 % d'acide chlorhydrique et évaporées à sec dans un ballon sous vide à 35 °C. Le résidu ainsi obtenu doit être purifié des substances volatiles non thiols contaminantes; il est, à cet effet, remis en suspension dans du dichlorométhane (Atrasol, 2 fois 10 ml) par sonication (35 kHz) pendant quelques secondes puis centrifugé à 1.500 g pendant 3 min. Le culot est repris par 2 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium (0,05 N) et transvasé dans un bécher qui reçoit également le rinçage à l'eau ultrapure (MilliQ, millipore) du tube de centrifugeuse et du balon jusqu'à un volume final de 25 ml. La décombinaison des thiols volatils du *p*-HMB est obtenue par addition de cystéine utilisée sous forme de solution aqueuse (320 mg dans 5 ml) préalablement ajustée à pH 7,0 et lavée par le dichlorométhane (Atrasol, 3 fois 1 ml). La réaction de décombinaison est conduite pendant 10 min sous agitation magnétique à pH 8,5 ajusté à l'hydroxyde de sodium (10 N). Les thiols volatils libérés sont enfin extraits au dichlorométhane (Atrasol); on réalise 3 extractions successives (3/1,5/1,5 ml) pendant 5 min sous agitation magnétique. Les phases organiques sont regroupées et concentrées sous flux d'azote dans un tube gradué de 10 ml jusqu'à environ 100 µl. Le concentrat est transvasé dans un petit tube à 200 µl et concentré jusqu'à 10 µl.

Analyses des thiols par CPG couplé à DPF, olfactométrie (DO) et SM: Le couplage CPG-DPF pour analyser les composés soufrés présents dans l'extrait organique est réalisé dans les conditions décrites par CHATONNET *et al.* (1992). Le chromatographe HP-5890-II est équipé d'une colonne capillaire du type BP-20 et/ou BPX-5 (SGE, 50 m x 0,22 mm, 0,25 µm). On injecte 0,4 µl d'extrait.

Le même chromatographe est couplé à un spectromètre de masse HP-5972 utilisé en impact électronique. On injecte 4 µl d'extrait. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que précédemment sauf l'isotherme initial et le temps de fermeture fixés à 3 min.

L'olfactométrie en sortie de colonne chromatographique pour repérer les zones odorantes évoquant le buis est effectuée selon la méthode décrite par DARRIET *et al.* (1991).

Les indices de rétention des composés détectés sont déterminés selon la méthode de Kováts (TRANCHANT 1982).

Seuil de perception de l'acétate de 3-mercaptohexanol: Il est mesuré, selon la méthode décrite par BOIDRON *et al.* (1989), par un jury de 25 dégustateurs entraînés soumis à des tests triangulaires portant sur des quantités croissantes de composé dans l'eau et dans un milieu modèle hydroalcoolique; le seuil de perception correspond à la concentration minimale perçue par 50 % des dégustateurs.

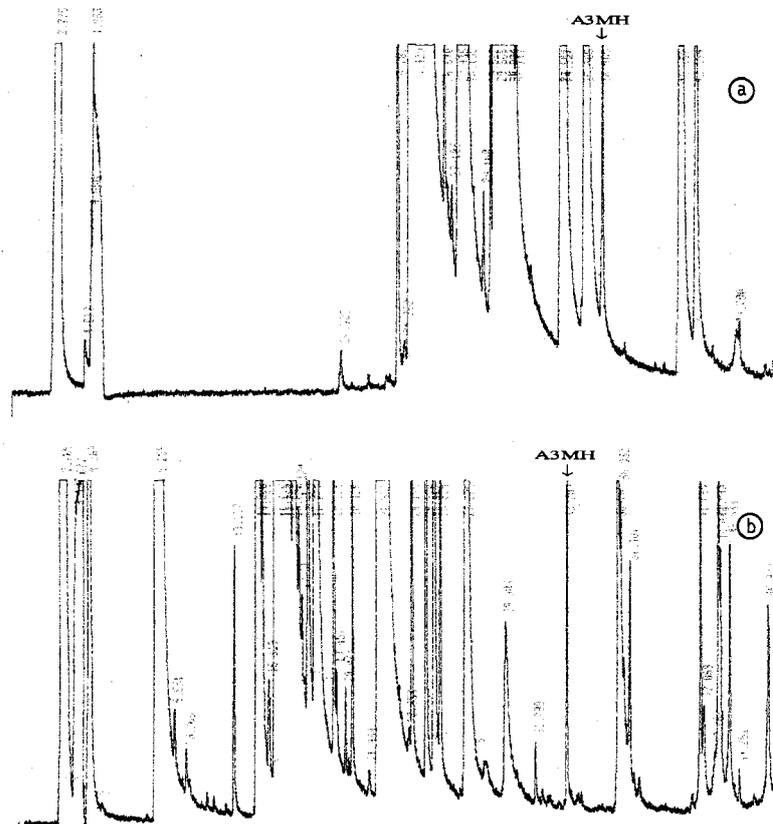


Fig. 1: Analyse par couplage CPG-DPF des thiols spécifiquement extraits d'un vin de Sauvignon; **a**: colonne BP-20; **b**: colonne BPX-5; le pic indiqué par la flèche correspond à l'acétate de 3-mercaptohexanol (A3MH).

GC-FPD analysis of an thiol extract from a Sauvignon wine; **a**: column BP-20; **b**: column BPX-5; the arrow points the peak of 3-mercaptohexylacetate.

## Résultats et discussion

Identification de l'acétate de 3-mercaptohexanol parmi les thiols volatils extraits d'un vin de Sauvignon: Les thiols volatils sont spécifiquement extraits d'un vin de Sauvignon selon la méthode décrite précédemment. Elle comprend une première extraction des composés volatils totaux du vin par le dichlorométhane, une deuxième extraction de la phase organique obtenue par une solution aqueuse de *p*-HMB combinant les thiols volatils, le séchage et la purification par lavage au dichlorométhane du complexe thiol-*p*-HMB formé, la décombinaison en présence d'un excès de cystéine en phase aqueuse des thiols volatils et enfin l'extraction de ces derniers par le dichlorométhane.

L'extrait d'un vin de Sauvignon est injecté en CPG-DPF sur 2 colonnes de polarités différentes: BP-20 et BPX-5 (Fig. 1 a et b). Dans les conditions chromatographiques décrites, aux temps de rétention 36,5 min pour BP-20 et 33,7 min pour BPX-5, le pic détecté en FPD et marqué par la flèche correspond en olfactométrie à une zone fortement odorante évoquant le buis. L'existence de ce composé, dont l'indice de Kováts est de 1650 sur BP-20, avait déjà été mis en évidence par couplage CPG-DO dans les vins de Sauvignon (DARRIET *et al.* 1991). Sa détection par DPF tient à la méthode d'extraction spécifique des thiols volatils du vin utilisée ici, qui comporte une phase de purification liquide-solide au dichlorométhane du complexe thiol-*p*-HMB permettant d'éliminer les contaminants volatils non thiols coextraits, en particulier le méthionol dont le temps de rétention sur colonne BP-20 est proche de celui du composé à odeur de buis recherché. Par ailleurs, l'acétate de 3-mercaptohexanol est mieux extrait que certains autres thiols par le dichlorométhane des solutions aqueuses à pH 8,5.

L'identification de ce composé est obtenue par couplage CPG-SM utilisé en impact électronique. Au temps de rétention du composé à odeur de buis, le chromatogramme de l'extrait de vin de Sauvignon comporte un pic (Fig. 2) et présente un spectre de masse possédant les fragments caractéristiques de l'acétate de 3-mercaptohexanol (Fig. 3). Enfin les caractéristiques chromatographiques (indice de Kováts) du composé à odeur de buis et de l'acétate de 3-mercaptohexanol sont identiques.

Ce thiol a été récemment identifié dans le fruit de la passion par ENGEL et TRESSL (1991) qui lui attribuent un caractère odorant «extrêmement fruité, suggérant le fruit de la passion, avec une note de type Riesling».

L'acétate de 3-mercaptohexanol est absent des moûts de raisin de Sauvignon non fermentés et apparaît au cours de la fermentation alcoolique, ce qui confirme des observations antérieures (DUBOURDIEU et DARRIET 1993). Cependant le mécanisme de révélation de ce composé reste à déterminer. On peut imaginer qu'il résulte de l'acétylation par la levure du 3-mercaptohexanol récemment identifié dans les vins de Sauvignon sous forme libre et dans les moûts sous forme d'un S-conjugué de la cystéine, le S-(3-hexan-1-ol)-L-cystéine (TOMINAGA *et al.* 1996).

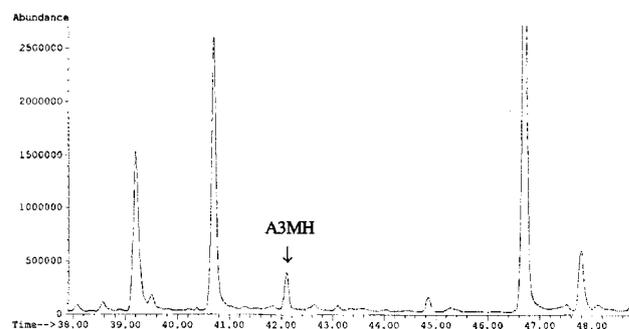


Fig. 2: Analyse par couplage CPG-SM (impact électronique) des thiols spécifiquement extraits d'un vin de Sauvignon (colonne BP-20); le pic indiqué par la flèche correspond à l'acétate de 3-mercaptohexanol (A3MH).

GC-MS analysis (electronic impact) of a thiol extract from a Sauvignon wine; column BP-20; the arrow points the peak of 3-mercaptohexylacetate.

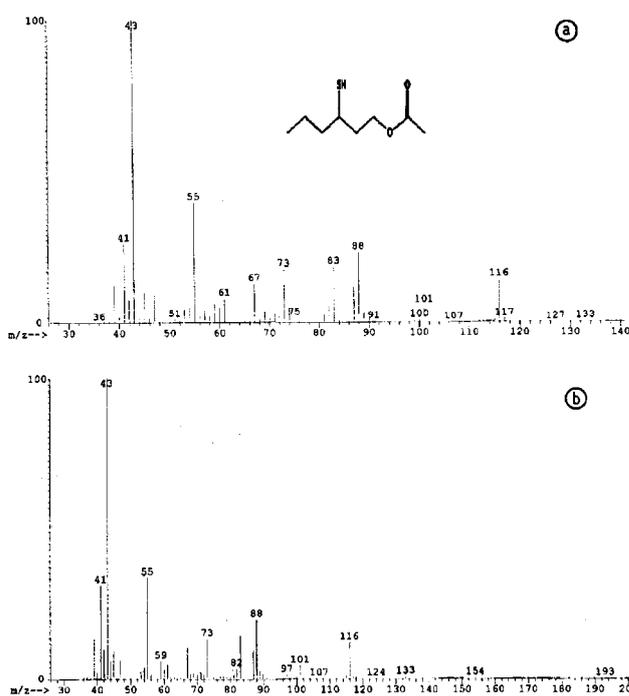


Fig. 3: Spectres de masse de l'acétate de 3-mercaptohexanol de référence (a) et isolé du vin de Sauvignon (b).

Mass spectra of 3-mercaptohexylacetate reference compound (a) and isolated from a Sauvignon wine (b).

Seuil de perception olfactive: La Fig. 4 représente en coordonnées logarithmiques la relation entre la teneur en acétate de 3-mercaptohexanol des deux milieux testés (eau et milieu modèle hydroalcoolique) et le pourcentage de dégustateur différenciant, en test triangulaire, l'échantillon supplémenté par rapport à l'échantillon témoin. Les seuils de perception ainsi mesurés sont respectivement dans l'eau et en solution modèle hydroalcoolique de 2,3 et 4,2 ng/l. Il s'agit donc d'un composé fortement odorant mais toutefois moins que la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (0,1ng/l dans l'eau et 0,8 ng/l en solution modèle) (DARRIET *et al.* 1995). L'odeur de ce composé est

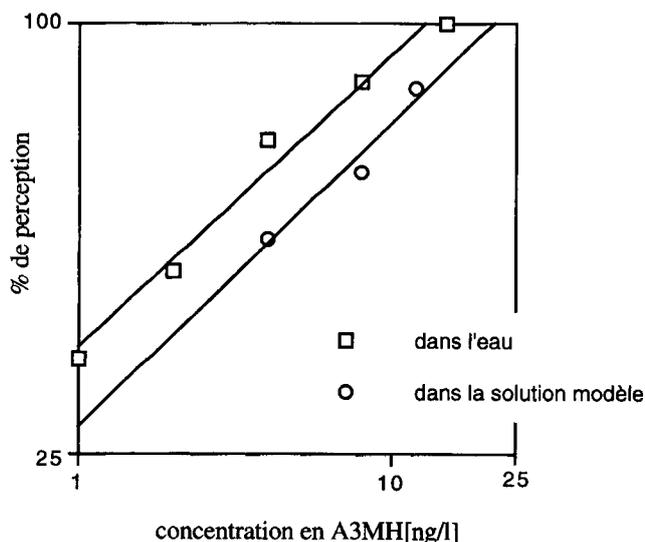


Fig. 4: Détermination du seuil de perception de l'acétate de 3-mercaptohexanol (A3MH) dans l'eau et en solution modèle.

Determination of perception threshold of 3-mercaptohexylacetate in water and in a model solution.

désagréable à forte concentration, comme c'est généralement le cas des thiols; il change au voisinage de son seuil de perception en évoquant le buis, mais aussi le fruit de la passion et le zeste de pamplemousse, descripteurs fréquemment utilisés pour caractériser l'arôme des vins de Sauvignon.

### Conclusion

Les vins du cépage Sauvignon contiennent, outre la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one à forte odeur de buis, un autre thiol un peu moins odorant possédant une odeur voisine mais avec une nuance plus fruitée identifiée à l'acétate de 3-mercaptohexanol. Ce composé n'avait été jusqu'ici caractérisé que dans le fruit de la passion. Il intervient vraisemblablement dans l'arôme caractéristique des vins de Sauvignon.

### Remerciements

Les auteurs remercient le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux pour sa contribution financière à cette étude, et le Dr. P. X. ETIÉVANT (INRA, Dijon, France) qui nous a fourni le premier échantillon de l'acétate de 3-mercaptohexanol.

### Références bibliographiques

- ALLEN, M. S.; LACEY, M. J.; BOYD, S.; 1994: Determination of methoxypyrazines in red wines by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agricult. Food Chem.* **42**, 1734-1738.
- ; --; HARRIS, R. L. N.; BROWN, W. V.; 1991: Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *Amer. J. Enol. Viticult.* **42**, 109-112.
- AUGUSTYN, O. P. H.; RAPP, A.; VAN WYK, C. J.; 1982: Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *S. Afr. J. Enol. Viticult.* **3**, 53-60.
- BAYONOVE, C.; CORDONNIER, R.; DUBOIS, P.; 1975: Etude d'un fraction caractéristique de l'arôme du raisin de la variété Cabernet Sauvignon; mise en évidence de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine. *C. R. Acad. Sci.* **281**, 75-78.
- BOIDRON, J. N.; CHATONNET, P.; PONS, M.; 1989: Incidence du traitement thermique du bois de chêne sur sa composition chimique. 2e partie: Evolution de certains composés en fonction de l'intensité du brûlage. *Connaiss. Vigne Vin* **23**, 223-250.
- BOUCHILLOUX, P.; DARRIET, P.; DUBOURDIEU, D.; 1996: Mise au point d'une méthode de dosage de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one dans les vins de Sauvignon. *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **30**, 23-29.
- CHATONNET, P.; LAVIGNE, V.; BOIDRON, J. N.; DUBOURDIEU, D.; 1992: Identification et dosage de sulfures volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Aliment.* **12**, 513-532.
- DARRIET, P.; 1993: Recherches sur l'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. Thèse Doc. Univ. Bordeaux II.
- ; LAVIGNE, V.; DUBOURDIEU, D.; 1991: Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage chromatographie en phase gazeuse-odométrie. *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **25**, 167-174.
- ; TOMINAGA, T.; DEMOLE, E.; DUBOURDIEU, D.; 1993: Mise en évidence dans le raisin de *Vitis vinifera* (var. Sauvignon) d'un précurseur de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one. *Biol. Pathol. Végét.* **316**, 1332-1335. *C. R. Acad. Sci., Paris.*
- ; --; LAVIGNE, V.; BOIDRON, J. N.; DUBOURDIEU, D.; 1995: Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-méthylpentan-2-one. *Flavour Fragrance J.* **10**, 385-392.
- DUBOURDIEU, D.; DARRIET, P.; 1993: Recherches sur l'arôme variétal du cépage Sauvignon. Mise en évidence dans les vins de composés soufrés à fort pouvoir odorant, formés au cours de la fermentation alcoolique à partir de précurseurs non volatils du moût. *Connaissance Aromatique des Cépages et Qualité des Vins. Actes Symp. Intern., Février 1993, Montpellier, France*, 58-64.
- ENGEL, K. H.; TRESSL, R.; 1991: Identification of new sulfur-containing volatiles in yellow passion fruits (*Passiflora edulis f. flavicarpa*). *J. Agricult. Food Chem.* **39**, 2249-2252.
- PEYNAUD, E.; 1980: *Le Goût du Vin*. Dunod Ed., Paris.
- TOMINAGA, T.; MASNEUF, I.; DUBOURDIEU, D.; 1996: Des conjugués de la cystéine, précurseur de certains arômes variétaux du Sauvignon. *Vème Symp. Intern. d'Enologie, «Actualités Œnologiques 95», Juin 1995, Bordeaux, France*, 44-49.
- TRANCHANT, J.; 1982: *Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse*. Masson, Paris.

Reçu le 3 Juin 1996