

Chaire de Technologie Alimentaire et d'Oenologie, Institut des Produits de la Vigne, E. N. S. A.,
Montpellier, France

Laboratoire des Arômes et Substances Naturelles, Institut des Produits de la Vigne, I. N. R. A.,
Montpellier, France

Etude des caroténoïdes du raisin à maturité

par

A. RAZUNGLES, C. L. BAYONOVE, R. E. CORDONNIER et R. L. BAUMES

Investigation on the carotenoids of the mature grape

S u m m a r y : High performance liquid chromatography was used to separate the carotenoid compounds in grapevine berries. By comparison with standards prepared by thin-layer-chromatography, β -carotene, lutein, 5,6-epoxy lutein, violaxanthin and neoxanthin were identified. Quantitative determination in 13 varieties of *Vitis vinifera* L. gave evidence that, in mature berries, the carotenoid contents can vary between 0.8 and 2.5 mg/kg of fresh weight, according to variety. β -carotene and lutein were present in larger quantities than the other carotenoids. The relative contents of each pigment were different from those of other fruits and resembled to those of leaves. Moreover, carotenoids were determined during 2 years in 2 varieties, Carignane and Sirah, grown in 8 different geographic sites.

Key words : pigments, berry, analysis, variety of vine, vineyard, France.

Introduction

De nombreuses études ont été réalisées sur les caroténoïdes, près de 450 composés ont déjà été identifiés (DAVIES 1976). Cependant, si leur présence dans les fruits est généralement connue, peu d'études ont porté sur le raisin (CURL 1964; BOTTRILL et HAWKER 1970; GROSS 1984), et parmi celles-ci un unique cépage de cuve, le Riesling a été analysé. Une étude plus complète portant sur d'autres cépages de cuve nous a semblé intéressante à mener.

La deuxième raison de notre investigation est l'importance reconnue des caroténoïdes en tant que précurseurs de composés volatils intervenant dans l'arôme. Ces derniers sont présents dans le raisin et le vin (SCHREIER *et al.* 1976, 1980) mais leur faible concentration les rend difficile à doser. Dans ce contexte l'analyse de ces précurseurs peut s'avérer intéressante.

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la recherche, à l'identification et au dosage d'un certain nombre de ces substances dans le raisin, en étudiant l'influence du cépage, du vignoble d'origine et du millésime.

Matériels et méthodes

Echantillonnage

100 g de baies mûres sont prélevées au hasard sur 10 grappes, elles-mêmes prélevées au hasard sur 10 cepes d'une même parcelle de vigne. Les grappes sont cueillies entre le 3ème et le 7ème noeud sur le rameau. Les échantillons sont lyophilisés et conservés sous vide à -20°C .

Extraction des caroténoïdes

Les baies sont broyées dans l'azote liquide au moyen d'un broyeur à bille. L'extraction des caroténoïdes se fait par l'acétone froide (+4 °C) en présence de carbonate de magnésium pour neutraliser les acides du fruit (CAMARA 1981). Sept extractions sont nécessaires pour épuiser la poudre de raisin (RAZUNGLES 1985); l'ensemble des extraits est ensuite filtré sur verre fritté.

Toutes ces opérations sont effectuées à l'abri de la lumière: les rayonnements induisent des photo-isomérisations *cis-trans* (DAVIES 1976) et même des photo-oxydations. La lumière blanche favorise la réduction des époxy-xanthophylles (COSTES 1968).

Saponification

Après élimination sous vide de l'acétone l'ensemble des extraits est évaporé à sec. On ajoute alors 50 ml d'éthanol et 5 ml de potasse aqueuse à 60 % aux fins de saponification. La solution ainsi obtenue est laissée 12 h, à l'obscurité et à +4 °C. Les caroténoïdes sont ensuite extraits par 100 ml d'éther éthylique. Puis celui-ci est éliminé par évaporation sous vide avant analyse.

A ce stade, deux techniques de fractionnement peuvent être utilisées, soit la chromatographie sur couche mince (CCM), soit la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Dans la première technique (CAMARA 1981), les caroténoïdes sont fractionnés par deux chromatographies successives. La première est faite sur silicagel G60 neutralisé, avec le mélange éluant éther de pétrole/acétone, 60 : 40, v/v, ce qui permet de séparer les xanthophylles. Les carotènes qui migrent selon le même Rf sont repris et chromatographiés sur kieselguhr G/magnésie, 90 : 10, w/w, avec le mélange éther de pétrole/benzène, 90 : 10, v/v comme solvant. L'identification des caroténoïdes et leur dosage sont effectués par comparaison des spectres avec les spectres des composés témoins (DAVIES 1976; CAMARA 1981).

Dans la seconde technique, les caroténoïdes sont repris dans 2 ml d'acétone et 1 ml de picrate de sodium en solution dans l'éthanol (0,1 mg/l), ce dernier composé jouant le rôle d'étalon interne (RAZUNGLES 1985). 10 µl de cette solution sont injectés dans le chromatographe. La méthode utilisée dérive de celle décrite par LANGER (1976) et reprise par BARANYAI *et al.* (1982), légèrement modifiée par l'utilisation du gradient linéaire suivant: de 0 à 20 min, acétone/eau, 50 : 50, v/v jusqu'à 100 % d'acétone. Le débit est de 1 ml/min. La colonne utilisée est une C₁₈, 5 µm, phase inverse, 220 × 4,6 mm (Brownlee Labs, Santa Clara, CA., USA), protégée par une précolonne 40 × 4,6 mm, de la même composition et de la même marque. L'appareil est un chromatographe Varian 5500. La détection se fait spectrophotométriquement à 450 nm (Varian UV 200). Un calculateur Varian Vista 402 assure le pilotage des gradients et les calculs.

Solvants et composés témoins

L'acétone (qualité analytique, Labosi, Paris, France) et l'eau utilisée sont distillées sur permanganate de potassium et filtrés (0,45 µm). L'éthanol (96 %) et l'éther de pétrole (Labosi) sont distillés sur potasse. L'éther éthylique est passé sur alumine (Merck, Darmstadt, RFA). Le benzène (Prolabo, Paris, France), le chlorure de sodium, le carbonate de magnésium, le kieselguhr G, le silicagel G, la magnésie, le picrate de sodium, la potasse (Merck) et le permanganate de potassium (Labosi) sont tous de qualité analytique. Les caroténoïdes témoins sont purifiés par chromatographie sur couche mince dans notre laboratoire.

Résultats et discussion

Contrairement à l'analyse des caroténoïdes de certains fruits dans laquelle la saponification n'est pas nécessaire (BUSHWAY et WILSON 1982), cette opération est, pour le raisin, indispensable par suite de la présence des lipides des pépins qui entraînent de mauvaises séparations tant en chromatographie sur couche mince qu'en chromatographie liquide à haute performance.

La mise sous azote du résidu sec après évaporation du solvant d'extraction (HSIEH YEN PING et KAREL 1983) n'a pas été jugée indispensable. Nous avons en effet vérifié sur les caroténoïdes analysés, l'absence de pertes ou d'isomérisation.

Pour l'étude quantitative, le picrate de sodium a été choisi comme étalon interne. Bien que son temps de rétention soit, en CLHP, assez éloigné de ceux des caroténoïdes, il nous a permis des dosages avec des erreurs relatives acceptable: 8 % pour le β -carotène et 6,5 % pour la lutéine. Depuis, certains auteurs (KHACHIK *et al.* 1986) ont utilisé la β -apo-8'-caroténal, étalon interne intéressant car son temps de rétention est voisin de ceux des caroténoïdes.

Tableau 1
Teneurs des principaux caroténoïdes sur un échantillon de Syrah à maturité
Levels of the main carotenoids from a sample of mature Sirah

| Pigment | Longueur d'onde des maxima observés | $\mu\text{g}/\text{kg}$ de baies |
|---------------------|--|----------------------------------|
| Néoxanthine | 413,7 – 437,0 – 465,6 dans l'éthanol | 148 |
| Violaxanthine | 416,8 – 439,6 – 469,0 dans l'éthanol | 66 |
| Lutéine-5,6-époxyde | 419,8 – 444,2 – 469,6 dans l'éthanol | 78 |
| Lutéine | 422,3 – 445,7 – 473,6 dans l'éthanol | 788 |
| β -Carotène | (425) – 448,6 – 475,6 dans l'éther de pétrole | 520 |

Identification et dosages

Ces opérations, réalisées par CCM, ont été faites sur le cépage Syrah (Tableau 1). Deux caroténoïdes principaux ont été mis en évidence, le β -carotène et la lutéine, qui représentent environ 80 % des caroténoïdes absorbant dans le domaine visible. On note, en outre, la présence de lutéine-5,6-époxyde, de violaxanthine et de néoxanthine en plus faibles quantités.

La CLHP permet également un dosage aisé des deux premiers composés. En revanche par suite de leurs faibles concentrations, les dosages de la néoxanthine, de la lutéine-5,6-époxyde et de la violaxanthine sont difficiles et peu précis. C'est particulièrement le cas pour le dernier caroténoïde cité dont la longueur d'onde d'absorption maximale est éloignée de la longueur d'onde de détection choisie (450 nm). C'est pourquoi nous avons retenu le β -carotène et la lutéine, exprimés en μg par kg de raisin frais, ainsi que, malgré leur faible concentration, la lutéine-5,6-époxyde et la néoxanthine

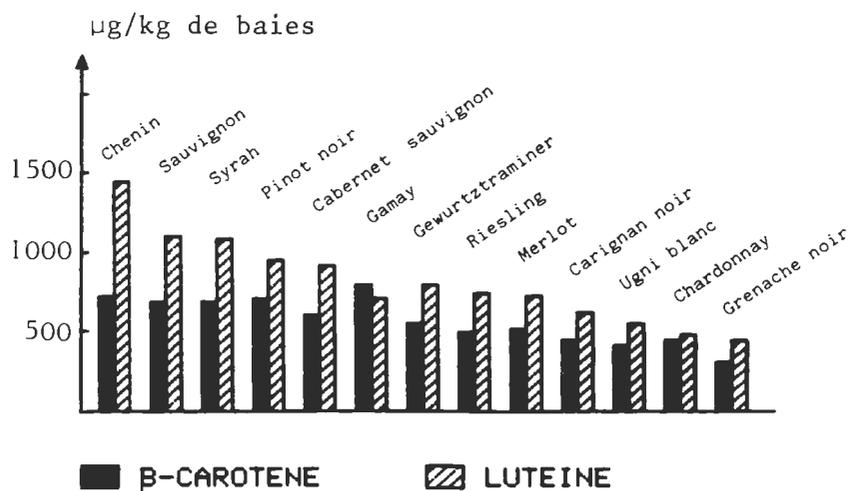


Fig. 1: Teneurs en β-carotène et en lutéine dans les baies de quelques cépages.
 Contents of β-carotene and lutein in the berries of different grapevine varieties.

Tableau 2

Proportions de 4 caroténoïdes dans 13 cépages à maturité (pour cent de la somme des aires des pics des 4 caroténoïdes)

Relative contents of 4 carotenoids from 13 mature varieties (per cent of the sum of peak areas of the 4 carotenoids)

| Cépage | β-Carotène | Lutéine | Lutéine-5,6-époxyde | Néoxanthine |
|-------------------------------|------------|---------|---------------------|-------------|
| Chenin | 31 | 60 | 3 | 6 |
| Sauvignon | 34 | 56 | 3 | 7 |
| Syrah | 35 | 54 | 3 | 8 |
| Pinot noir | 38 | 52 | 4 | 6 |
| Cabernet-Sauvignon | 36 | 54 | 4 | 6 |
| Gamay | 48 | 42 | 4 | 6 |
| Gewurtztraminer | 37 | 53 | 4 | 6 |
| Riesling | 36 | 52 | 5 | 7 |
| Merlot | 38 | 53 | 3 | 6 |
| Carignan noir | 36 | 50 | 6 | 8 |
| Ugni blanc | 39 | 52 | 5 | 4 |
| Chardonnay | 43 | 47 | 3 | 7 |
| Grenache noir | 36 | 51 | 4 | 9 |
| % Moyen de chaque caroténoïde | 37 | 52 | 4 | 7 |

exprimées en pour cent de la somme des aires de pics des quatre caroténoïdes pris en compte.

Teneurs en caroténoïdes du raisin

13 cépages ont fait, à maturité, l'objet de cette étude. Comme le montrent les résultats de la Fig. 1 et du Tableau 2, les teneurs varient d'un facteur 2—2,8. On constate que certains cépages donnant des vins aromatiques, parfois à odeur caractéristique de violette comme la Syrah, le Pinot noir, le Gamay et dans certains cas le Cabernet-Sauvignon, sont riches en caroténoïdes. Inversement, des cépages donnant des vins n'ayant pas cette caractéristique aromatique tels que Ugni blanc, Chardonnay et Grenache noir, sont pauvres en ces composés. D'un point de vue technologique ces teneurs peu-

($\mu\text{g}/\text{kg}$ de baies)

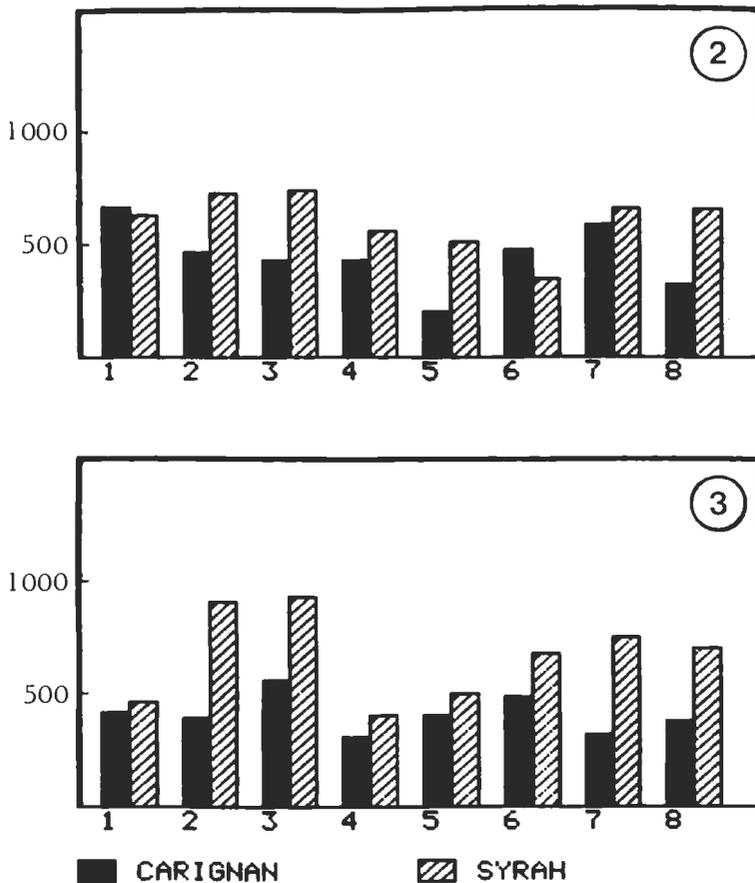


Fig. 2 et 3: Influence de la situation géographique sur les teneurs en β -carotène de 2 cépages mûrs, issus de 8 vignobles différents. — Fig. 2: millésime 1982; Fig. 3: millésime 1984.

Effect of geographic site on the β -carotene contents of 2 mature varieties from 8 different vineyards. — Fig. 2: 1982 vintage; Fig. 3: 1984 vintage.

vent cependant être suffisantes si on considère les caroténoïdes en tant que précurseurs de molécules odorantes à seuils de perception très bas, comme par exemple la β -ionone (ETIEVANT *et al.* 1983).

D'autre part, on constate (Tableau 2) que les proportions relatives des quatre caroténoïdes dosés varient peu d'un cépage à l'autre. Comme dans le cas précédent de la Syrah, la lutéine représente, en moyenne, près de la moitié des caroténoïdes de la baie, le β -carotène plus du tiers. La concentration de ce dernier, dans presque tous les cas est inférieure à celle de la lutéine, ce qui confirme certains résultats précédents relatifs à un autre cépage, le Dabouki (GROSS 1984). Seul le Gamay a une concentration plus élevée en β -carotène qu'en lutéine, comme le Thompson Seedless (CURL 1964) et le Riesling (GROSS 1984), ce que nous n'avons pas retrouvé dans le Riesling que nous avons analysé.

($\mu\text{g}/\text{kg}$ de baies)

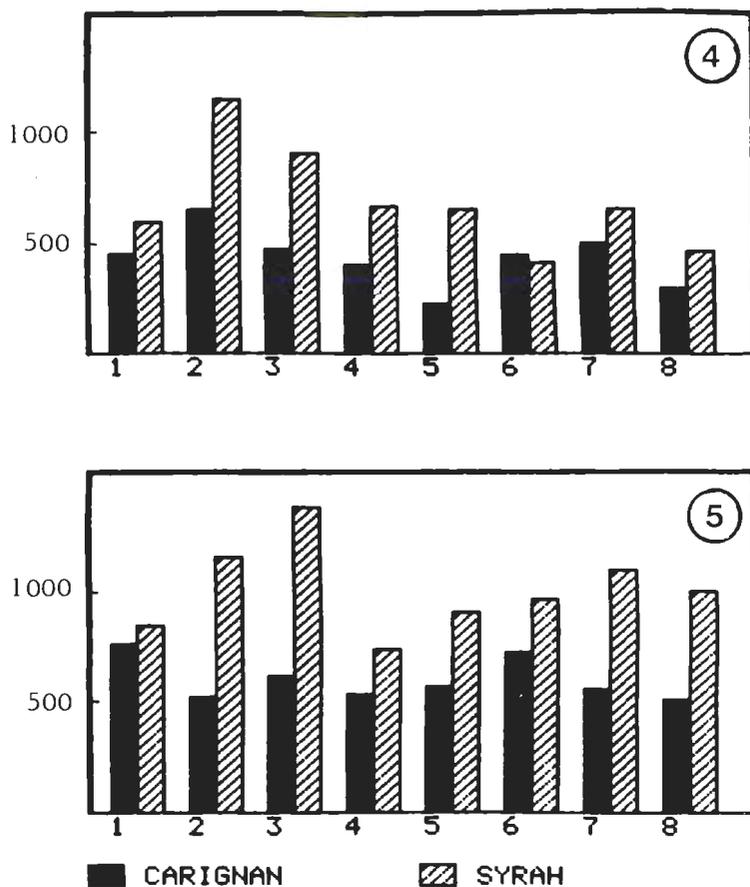


Fig. 4 et 5: Influence de la situation géographique sur les teneurs en lutéine de 2 cépages mûrs, issus de 8 vignobles différents. — Fig. 4: millésime 1982; Fig. 5: millésime 1984.

Effect of geographic site on the lutein contents of 2 mature varieties from 8 different vineyards. — Fig. 4: 1982 vintage; Fig. 5: 1984 vintage.

Les concentrations en lutéine-5,6-époxyde (4 % en moyenne des caroténoïdes dosés) sont toujours plus faibles que celles en néoxanthine (7 % en moyenne), exception faite chez l'Ugni blanc où ces composés sont en quantités égales (Tableau 2). D'une façon générale tous les cépages sont pauvres en caroténoïdes époxydés (même en tenant compte de la violaxanthine, non dosée, mais dont les aires de pic correspondantes sont inférieures à celles de la lutéine-5,6-époxyde).

Il est intéressant de noter que cette distribution en caroténoïdes ressemble davantage à celle d'une feuille (MONEGER 1968) qu'à celle d'un fruit (CURL 1964). En effet, nos résultats montrent que dans le raisin le β -carotène et les xanthophylles sont présents à des teneurs semblables à celles trouvées dans la feuille, alors que dans de nombreux fruits les teneurs respectives en β -carotène et parfois en lutéine ne sont pas les plus importantes (GOODWIN 1980).

Tableau 3

Influence du millésime sur les proportions en caroténoïdes dans 2 cépages issus de 8 vignobles différents (pour cent de la somme des aires des pics des 4 caroténoïdes)

Effect of the vintage on the relative contents of carotenoids of 2 varieties from 8 different vineyards (per cent of the sum of peak areas of the 4 carotenoids)

| Site de Récolte | β -Carotène | | Lutéine | | Lutéine-5,6-époxyde | | Néoxanthine | |
|-----------------|-------------------|------|---------|------|---------------------|------|-------------|------|
| | 1982 | 1984 | 1982 | 1984 | 1982 | 1984 | 1982 | 1984 |
| Syrah | | | | | | | | |
| 1 | 46 | 31 | 44 | 57 | 2 | 3 | 8 | 9 |
| 2 | 34 | 39 | 55 | 50 | 3 | 4 | 8 | 7 |
| 3 | 42 | 36 | 51 | 53 | 3 | 4 | 4 | 7 |
| 4 | 42 | 31 | 50 | 56 | 2 | 3 | 6 | 10 |
| 5 | 39 | 31 | 49 | 57 | 3 | 4 | 9 | 8 |
| 6 | 41 | 37 | 49 | 53 | 3 | 4 | 7 | 6 |
| 7 | 45 | 36 | 46 | 53 | 3 | 4 | 6 | 7 |
| 8 | 55 | 36 | 38 | 51 | 2 | 4 | 5 | 9 |
| % Moyen | 43 | 35 | 48 | 54 | 3 | 4 | 7 | 8 |
| Carignan | | | | | | | | |
| 1 | 52 | 29 | 35 | 53 | 4 | 7 | 9 | 11 |
| 2 | 36 | 35 | 50 | 47 | 6 | 7 | 8 | 11 |
| 3 | 41 | 39 | 47 | 44 | 5 | 6 | 7 | 11 |
| 4 | 43 | 29 | 42 | 50 | 5 | 8 | 10 | 13 |
| 5 | 39 | 35 | 42 | 48 | 6 | 6 | 13 | 11 |
| 6 | 44 | 33 | 42 | 49 | 4 | 6 | 10 | 12 |
| 7 | 47 | 29 | 41 | 50 | 4 | 8 | 8 | 13 |
| 8 | 45 | 35 | 42 | 47 | 3 | 7 | 10 | 11 |
| % Moyen | 43 | 33 | 43 | 48 | 5 | 7 | 9 | 12 |

Influence du millésime et du lieu d'implantation du vignoble sur les teneurs en caroténoïdes du raisin

Deux cépages, le Carignan et la Syrah, aux teneurs nettement différentes en caroténoïdes, ont été comparés au cours des millésimes 1982 et 1984 et selon huit sites viticoles du Sud de la France.

Comme le montrent les Fig. 2—5, dans presque tous les cas, quels que soient le lieu d'implantation et l'année, la Syrah est plus riche en β -carotène et en lutéine que le Carignan. Deux exceptions cependant sont à noter: d'une part, en 1982, les teneurs du Carignan sont égales (site n° 1) ou supérieures (site n° 6) à celles de la Syrah, d'autre part, indépendamment du millésime, il existe des différences très nettes entre les deux cépages et en faveur de la Syrah sur certains sites viticoles (n° 2, 3 et 8).

Enfin nous observons (Fig. 4 et 5) une augmentation significative des teneurs en lutéine entre les millésimes 1982 et 1984 pour les deux cépages, à la différence du β -carotène qui lui varie peu. Les données du Tableau 3 montrent en outre que ces variations sont aussi le fait des autres xanthophylles: lutéine-5,6-époxyde et néoxanthine.

Avant d'interpréter ces résultats sur le plan physiologique ou agronomique, d'autres études sont à poursuivre sur ce sujet afin de faire la part des différences dues au cépage et celles dues à la situation agro-climatique du vignoble.

Résumé

La chromatographie liquide à haute performance a été utilisée pour séparer et doser les caroténoïdes du raisin. Ces composés ont été identifiés par comparaison à des étalons purifiés par chromatographie sur couche mince.

Une analyse quantitative portant sur 13 variétés de *Vitis vinifera* L. au stade mûr a montré que la teneur en caroténoïdes pouvait varier entre 0,8 et 2,5 mg/kg de poids frais selon le cépage. Le β -carotène et la lutéine sont les deux principaux caroténoïdes du raisin. La lutéine-5,6-époxyde, la violaxanthine et la néoxanthine sont également présentes mais en quantités nettement moins importantes. Les proportions relatives de chaque caroténoïde offrent un profil plus proche de celui d'une feuille que de ceux de nombreux fruits.

De plus, au cours de 2 années, les caroténoïdes ont été analysés sur 2 variétés, le Carignan et la Syrah, plantés sur 8 sites géographiques différents.

Références bibliographiques

- BARANYAI, M.; MATUS, Z.; SZABOLCS, J.; 1982: Determination, by H. P. L. C., of carotenoids in paprika products. *Acta Aliment.* **11**, 309—323.
- BOTTRILL, D. E.; HAWKER, J. S.; 1970: Chlorophylls and their derivatives during drying of Sultana grapes. *J. Sci. Food Agric.* **21**, 193—196.
- BUSHWAY, R. J.; WILSON, A. M.; 1982: Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by HPLC. *Canad. Inst. Food Sci. Technol.* **15**, 165—169.
- CAMARA, B.; 1981: Mécanismes et facteurs de la biogénèse des caroténoïdes dans les chromoplastes du fruit de poivron (*Capsicum annuum* L.). Thèse de Doctorat d'Etat. Université Paris VI.
- COSTES, C.; 1968: Caroténoïdes et photosynthèse: Variations induites de la teneur en pigments dans des folioles excisées de tomate. *Ann. Physiol. Vég.* **10**, 171—197.
- CURL, A. L.; 1964: The carotenoids of several low-carotenoid fruits. *J. Food Sci.* **24**, 241—245.

- DAVIES, B. H.; 1976: Carotenoids. In: GOODWIN, T. W., (Ed.): Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Vol. II, 38—165. Academic Press, London, New-York.
- ETHEVANT, P. X.; ISSANCHOU, S. N.; BAYONOVE, C.; 1983: The flavour of Muscat wine: The sensory contribution of some volatile compounds. *J. Sci. Food Agricult.* **34**, 497—504.
- GOODWIN, T. W.; 1980: The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. I, Plants. 2nd Ed., Ed. Chapman and Hall, London.
- GROSS, J.; 1984: Chlorophyll and carotenoid pigments of grapes (*Vitis vinifera*). *Gartenbauwiss.* **49**, 180—182.
- HSIEH YEN PING, C.; KAREL, M.; 1983: Rapid extraction and determination of α - and β -carotene in foods. *J. Chromatogr.* **259**, 515—518.
- KHACHIK, F.; BEECHER, G. R.; WHITTAKER, N. F.; 1986: Separation, identification, and quantification of the major carotenoid and chlorophyll constituents in extracts of several green vegetables by liquid chromatography. *J. Agricult. Food Chem.* **34**, 603—616.
- LANGER, K.; 1976: Trennung von Carotenoïden mit Hilfe der HPLC. Diss. Univ. Erlangen-Nürnberg. In: MACHEREY-NAGEL; 1984: HPLC-Programme, 142 pp.
- MONEGER, R.; 1968: Contribution à l'étude de l'influence exercée par la lumière sur la biosynthèse des caroténoïdes chez la *Spirodela polyrrhiza* (L.) SCHLEIDEN. *Physiol. Vég.* **6**, 165—202.
- RAZUNGLAS, A.; 1985: Contribution à l'étude des caroténoïdes du raisin. Thèse de Docteur-Ingénieur, Ecole Natl. Supér. Agron., Montpellier.
- SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A.; 1976: Identification of volatile constituents from grapes. *J. Agricult. Food Chem.* **24**, 331—335.
- — ; — — ; ABRAHAM, K. O.; 1980: Identification and determination of volatile constituents in Burgundy Pinot noir wines. *Lebensm. Wiss. Technol.* **13**, 318—321.

Eingegangen am 5. 2. 1987

A. RAZUNGLAS
Chaire de Technologie Alimentaire et d'Oenologie
Institut des Produits de la Vigne, E. N. S. A.
9, Place Viala
34060 Montpellier Cedex
France

C. L. BAYONOVE, R. E. CORDONNIER et R. L. BAUMES
Laboratoire des Arômes et Substances Naturelles
Institut des Produits de la Vigne, I. N. R. A.
9, Place Viala
34060 Montpellier Cedex
France