

Nouvelles applications de la chromatographie en phase gazeuse à l'analyse des vins et au contrôle de leur qualité

par

P. RIBÉREAU-GAYON et A. BERTRAND

Introduction

Les études de la composition chimique du vin, effectuées à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse (RIBÉREAU-GAYON 1971), ont porté jusqu'à maintenant presque exclusivement sur les constituants volatils qui peuvent être analysés directement, sans traitement préalable. Cependant on sait que de nombreuses substances organiques, dites «fixes», sont susceptibles de transformation en dérivés présentant une volatilité et une stabilité suffisantes pour être séparés et dosés par chromatographie.

A l'heure actuelle, on connaît exclusivement trois publications dans ce domaine de l'analyse du vin (BRUNELLE *et al.* 1967, MATTICK *et al.* 1970, MATTICK et RICE 1970); elles envisagent exclusivement le dosage des principaux acides organiques fixes et du glycérol.

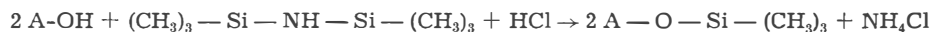
Les premiers résultats que nous avons obtenus, décrits dans cette publication, montrent que cette méthode présente une beaucoup plus grande généralité, car il est possible de doser de nombreux constituants du vin: sucres, polyalcools, acides organiques, composés phénoliques.

Dans le domaine de l'oenologie, cette nouvelle méthode laisse entrevoir des applications importantes; il était donc opportun de la faire connaître avant même que les mises au point techniques soient définitivement terminées.

Formation de dérivés silylés

Parmi les dérivés volatils, obtenus à partir de corps eux-mêmes non volatils, on peut envisager les esters ou les éthers méthylés, les composés acétylés, également les acétals; mais ils ne sont valables que pour certaines fonctions chimiques particulières; par ailleurs, leur formation quantitative peut être difficile, notamment par suite de modifications de structure au cours de la réaction. Par contre, la formation des dérivés triméthylsilylés présente un intérêt certain parce que ces dérivés sont, non seulement thermiquement stables et très volatils, mais aussi relativement faciles à former quantitativement; d'autre part on peut les obtenir avec de nombreuses fonctions chimiques (acides, alcools, phénols), plus particulièrement avec tous les corps possédant un hydrogène mobile.

On utilise le plus souvent, comme mélange silanisant, l'hexaméthylidisilazane dans la pyridine, en présence de triméthylchlorosilane ou mieux d'acide trifluoroacétique, agissant comme catalyseur. En milieu chlorhydrique la réaction est la suivante:



Bien entendu, une même molécule fixe autant de radicaux $\text{—Si}(\text{CH}_3)_3$ qu'elle possède d'hydrogènes mobiles, ce qui accroît la volatilité; on explique ainsi la possibilité de chromatographier de grosses molécules, par exemple les sucres, qui possèdent de nombreux sites réactionnels.

D'après SWEeley (1965), la considération de modèles moléculaires montre que ces dérivés possèdent une forme sphérique dans laquelle la surface de la molécule est recouverte par tous les groupes méthyles non réactionnels. Ce fait expliquerait en partie leur grande volatilité malgré le poids moléculaire élevé; la cause essentielle est cependant la suppression de toutes les liaisons hydrogène intra ou inter moléculaire.

La silylation des composés peu volatils en vue de leur étude par chromatographie en phase gazeuse a été utilisée pour la première fois par LANGER *et al.* en 1958 pour la séparation des phénols, puis par HEDGLEY et OVEREND (1960) pour étudier les sucres; SWEeley *et al.* (1963) ont effectué un travail très important dans ce domaine.

Dans le cas du vin, à partir d'une même prise d'essai, on obtient le mélange des dérivés silylés des constituants susceptibles de réagir. Ils sont séparés par chromatographie dans différentes conditions (Fig. 1 et 2). On observe plusieurs pics correspondant à de nombreux corps dont 18 ont été identifiés par comparaison, à l'aide de produits de référence, des temps de rétention et des spectres infrarouge. Les isomères α et β des différents sucres sont séparés; dans le cas de l'acide galacturonique on observe en outre un isomère γ .

Mode opératoire

20 cm³ de vin sont additionnés de 0,2 cm³ d'HCl pur et de 2 cm³ d'une solution, à 15 g par litre, dans l'alcool à 50°, d'acide vanillique, utilisé comme étalon interne

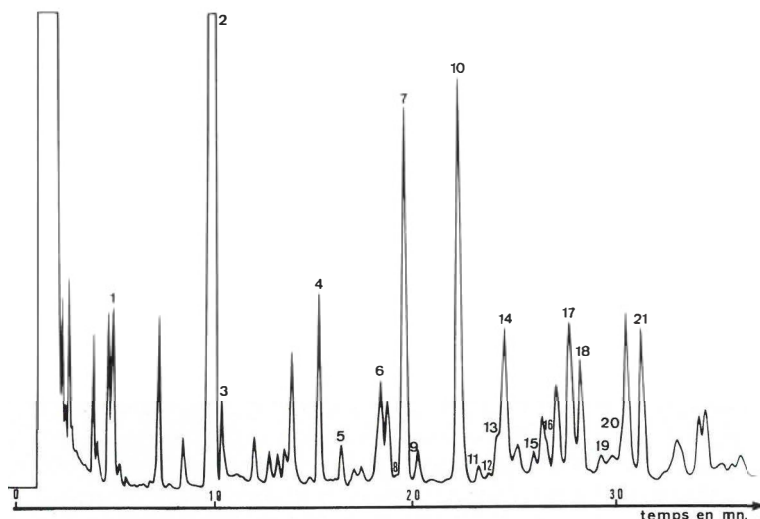


Fig. 1: Chromatogramme des dérivés silylés d'un vin rouge.

Injection de 4 mm³ dans une colonne de UCCW 982 à 10% enrobée sur Gas-Chrom Q, 80–100 Mesh; tube en acier inoxydable de 1/8 de pouce de diamètre et de 3 m de long. Température du four programmée de 120° C à 260° C à raison de 4° C par minute. Atténuation de l'électromètre: 320.

Identification des pics: 1 acide lactique; 2 glycérol; 3 acide succinique; 4 acide malique + acide citramalique; 5 érythritol; 6 tartrate acide d'éthyle (?); 7 acide tartrique; 8 et 9 arabinose α et β ; 10 acide vanillique (étalon interne); 11 arabitol; 12 tryptophol; 13 acide citrique; 14 fructose α et β ; 15 acide γ galacturonique; 16 glucose α ; 17 mannitol + acide α galacturonique; 18 glucose β ; 19 acide β galacturonique; 20 acide mucique; 21 méso-inositol.

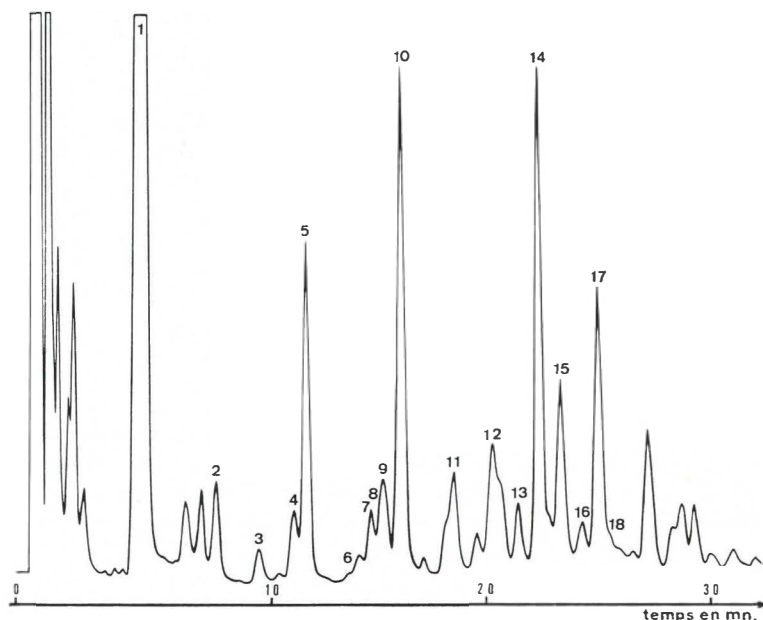


Fig. 2: Chromatogramme des dérivés silylés d'un vin rouge.

Echantillon, volume injecté et température: voir Fig. 1. Colonne de OV 17 à 10% enrobée sur Gas-Chrom Q, 80-100 Mesh; tube en acier inoxydable de $\frac{1}{8}$ de pouce de diamètre et de 3 m de long. Atténuation de l'électromètre 640.

Identification des pics: 1 glycérol + acide lactique; 2 acide succinique; 3 érythritol; 4 acide citramalique; 5 acide malique; 6 et 8 arabinose α et β ; 7 arabitol; 9 tartrate acide d'éthyle (?); 10 acide tartrique; 11 fructose α et β ; 12 mannitol; 13 glucose α + acide citrique + acide γ galacturonique; 14 acide vanillique (étalon interne); 15 glucose β ; 16 acide α galacturonique; 17 méso-inositol; 18 acide β galacturonique + acide mucique.

pour les dosages. Les dérivés silylés étant formés exclusivement en milieu anhydre, on prélève 2 cm³ du mélange précédent qui sont séchés par évaporation sous vide ou par lyophilisation. On ajoute 0,1 cm³ de pyridine, 0,8 cm³ d'hexaméthylsilazane et 0,1 cm³ d'acide trifluoroacétique (catalyseur) (Browst et Lorr, 1966). On agite 30 minutes dans un bain à ultrasons et on abandonne pendant 12 heures. On obtient une solution jaune orangé contenant un léger précipité blanchâtre.

La solution est introduite dans l'appareil de chromatographie. Deux colonnes, utilisant des phases stationnaires à base de silicone (UCCW 982 et OV 17), nous ont donné les meilleures séparations (Fig. 1 et 2). Jusqu'à maintenant nous avons toujours opéré en température programmée; on arrive ainsi à saisir des corps dont la concentration dans le vin est de l'ordre de 100 mg par litre. En travaillant en isotherme, on pourra certainement descendre à une sensibilité de 10 mg par litre ou même moins, mais alors un même chromatogramme ne permettra de doser que quelques corps.

Les dosages sont effectués en rapportant les surfaces des pics à des courbes de référence obtenues avec le même mode opératoire, en utilisant comme étalon interne, par exemple l'acide vanillique.

Applications

1^o) Cette méthode est d'abord susceptible d'application au remplacement de certaines méthodes chimiques particulièrement complexes (acide succinique). Elle

prendra tout son intérêt dans la mesure où l'on recherchera, en une seule manipulation, le dosage de plusieurs constituants du vin. Dans le cas des acides en particulier, il est possible que nous soyons conduits à proposer un isolement préalable de tous les acides sur échangeur d'ions, de façon à avoir une meilleure séparation de chacun d'eux, notamment de l'acide citrique et de l'acide galacturonique.

2°) Les travaux de PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1964) et de GUIMBERTEAU (1969) ont montré l'importance de l'arabitol, de l'érythritol et du mannitol qui sont des produits du développement des bactéries. Bien que leurs concentrations puissent atteindre quelques grammes par litre, leur étude dans le vin n'a jamais été approfondie, par suite du manque de méthode de dosage qui est aujourd'hui possible à l'aide de la chromatographie des dérivés silylés.

3°) Les traces éventuelles de sucres contenus dans les vins secs sont appréciées par le dosage des matières réductrices, dont la concentration ne descend jamais au-dessous de 1 à 2 g par litre. La méthode chromatographique permet de constater d'ores et déjà que les sucres représentent une faible fraction seulement de ces matières réductrices résiduelles; elle permet donc, avec beaucoup plus de précision que le dosage chimique, de contrôler la disparition des sucres fermentescibles, donc la stabilisation biologique du vin. En outre il sera intéressant de rechercher les corps, autres que le glucose, le fructose et les pentoses, qui réagissent avec la liqueur de Fehling.

4°) L'édulcoration des vins par addition de sucre ou de moût de raisin est contrôlée par le taux des sucres totaux et par la déviation polarimétrique (rapport P/a); on cherche ainsi à mesurer le rapport glucose sur fructose (G/F) égal à 1 dans le sucre commercial hydrolysé ou le jus de raisin, inférieur à 1 après fermentation parce que dans la vinification, la fermentation du glucose est plus rapide que celle du fructose. Mais on sait que le rapport P/a présente quelquefois des valeurs anormales, dans le cas des vins issus de raisins pourris notamment; la possibilité de dosage de l'acide galacturonique (Fig. 1 et 2) pourrait apporter une interprétation des P/a anormaux. Surtout, la méthode chromatographique, en permettant la mesure directe de G/F , évite systématiquement les irrégularités éventuelles du rapport P/a ; en outre la recherche de l'édulcoration devient possible sur les vins peu sucrés pour lesquels les déviations polarimétriques sont trop faibles pour être mesurées avec précision.

5°) La présence éventuelle dans le vin de différents antiseptiques (acide sorbique, acides hydroxybenzoïques) peut être contrôlée par la chromatographie de leurs dérivés silylés.

6°) A côté des applications précédentes dont les principes sont définitivement acquis et pour lesquels il reste seulement à mettre au point les détails expérimentaux, on peut formuler certaines hypothèses qui pourraient être à la base de nouvelles recherches. A titre d'exemple, nous avons constaté qu'un échantillon de saccharose commercial donne trois pics sur les chromatogrammes et un produit pur pour laboratoire en donne un seul; il serait intéressant d'étudier le comportement, au cours de la fermentation, des trois constituants et d'autres impuretés éventuelles du saccharose, en vue de la recherche de la chaptalisation de la vendange ou du moût. Egalement on peut envisager des variations, en fonction de la composition chimique du vin, du rapport des deux isomères α et β du glucose et du fructose, entraînant une modification de la déviation polarimétrique, indépendante de la teneur en sucre; ce problème peut aussi être étudié avec la nouvelle méthode chromatographique.

Enfin les composés phénoliques qui n'ont pas encore été envisagés dans nos études, peuvent également être dosés avec cette méthode et on peut espérer des résultats intéressants dans le domaine de la structure des tanins condensés.

Conclusion

La méthode décrite dans ce travail, utilisant la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants du vin, après leur transformation en dérivés silylés, est appelée à remplacer dans un avenir plus ou moins proche certaines méthodes chimiques actuellement en usage, d'autant plus qu'elle permet, en une seule manipulation, de doser plusieurs composés dont les dosages individuels sont plus ou moins complexes avec les méthodes classiques. Mais, les possibilités de cette nouvelle méthode dépassent le cadre de l'analyse traditionnelle des vins; en effet on accède ainsi à de nouveaux dosages pour lesquels il n'existe pas actuellement de méthodes satisfaisantes; par conséquent on peut espérer ainsi résoudre de nouveaux problèmes de l'oenologie et avancer vers une connaissance plus approfondie de la composition chimique des vins et de ses variations, en relation avec leurs caractères organoleptiques.

Bibliographie

- BROBST, K. M. and LOTT, C. E., 1966: Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives. *J. Cereal. Chem.* **43**, 35—43.
- BRUNELLE, R. L., SHOENEMAN, R. L. and MARTIN, G. E., 1967: Quantitative determination of fixed acids in wines by gas-liquid chromatographic separation of trimethylsilylated derivatives. *J. Assoc. Analyt. Chem.* **2**, 329—334.
- GUIMBERTEAU, G., 1969: Etude de la formation des polyols dans la fermentation lactique des glucides. *Connaiss. Vigne Vin*, **1**, 1—41.
- HEDGLEY, E. J. and OVEREND, W. G., 1960: Trimethylsilyl derivatives of carbohydrates. *Chem. and Ind. (London)*, 378—379.
- LANGER, S. H., PANTAGES, P. and WENDER, I., 1958: Gas-liquid chromatographic separation of phenols as trimethylsilyl ethers. *Chem. and Ind. (London)*, 1664—1665.
- MATTICK, L. R. and RICE, A. C., 1970: Quantitative determination of lactic acid and glycerol in wines by gas chromatography. *Amer. J. Enol. Viticult.* **4**, 205—212.
- — — and MOYER, J. C., 1970: Determination of the fixed acids in musts and wines by gas chromatography. *Amer. J. Enol. Viticult.* **4**, 179—183.
- PEYNAUD, E. et GUIMBERTEAU, G., 1964: Sur les polyols formés dans la fermentation lactique des glucides. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **258**, 4626—4628.
- RIBÉREAU-GAYON, P., 1971: Les arômes des vins et des eaux-de-vie. Leur formation et leur évolution. *Bull. OIV* **44**, 428—483.
- — — et BERTRAND, A., 1971: Dosage simultané dans le vin des acides organiques, des polyalcools et des sucres. Applications. *C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. (Paris)* **273**, 1761—1762.
- SWEETLEY, C. C., 1965: Analyse des hydrates de carbone par chromatographie en phase gazeuse. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **7**, 1477—1494.
- — —, BENTLEY, R., MAKITA, M. and WELLS, W. W., 1963: Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Amer. Chem. Soc.* **20**, 2497—2507.

Eingegangen am 14. 10. 1971

Prof. Dr. P. RIBÉREAU-GAYON
Univ. de Bordeaux
Inst. d'Oenologie
351 Cours de la Libération
Talence
France