

Recherche et Estimation du Saccharose Ajouté aux Moûts et aux Vins à l'Aide de la Chromatographie sur Papier

par

G. GUIMBERTEAU et E. PEYNAUD

L'addition de saccharose à la vendange (chaptalisation) est une pratique assez courante en vinification, autorisée de façon limitée, mais constante dans certains pays et dans d'autres régions seulement certaines années. Enfin dans d'autres pays cette pratique est toujours interdite. La recherche analytique du sucrage est un des problèmes les plus difficiles posés aux services de contrôle. D'ailleurs pendant la fermentation, le saccharose ajouté est hydrolysé par la saccharase des levures et le sucrage ne laisse pas de traces. Il convient de rappeler du reste que les raisins contiennent naturellement de très faibles quantités de saccharose.

Par contre la loi interdit généralement l'addition de saccharose au vin pour les édulcorer (c'est notamment le cas de la loi française) et ce sucre ne peut exister dans le vin, même à l'état de traces, que s'il y a été introduit. La recherche de cette fraude est délicate en raison de l'instabilité du saccharose dans les vins. Les vins jeunes surtout contiennent de la saccharase, si bien que le saccharose introduit est parfois rapidement hydrolysé et qu'au moment de l'analyse de contrôle, il s'agit toujours de rechercher et de mettre en évidence des doses faibles. Les méthodes chimiques ne permettent pas alors de conclure avec certitude. Nous avons donc essayé de mettre à profit la grande sensibilité de la technique chromatographique pour rechercher le saccharose dans les vins.

Méthodes antérieurement proposées

La méthode chimique la plus couramment utilisée pour la recherche et le dosage du saccharose dans les vins consiste à doser les sucres réducteurs avant et après hydrolyse acide, en milieu chlorhydrique. C'est la méthode officielle française (Arrêté du 24 juin 1963) qui reprend le principe de l'ancienne méthode de 1907. La spécificité de la méthode est faible, des polysaccharides naturels pouvant dans ces conditions libérer des sucres réducteurs. De ce fait encore la précision est mauvaise et cette méthode ne permet pas de déterminer avec certitude la présence de quantités de saccharose inférieures à 1 ou 2 g par litre.

La méthode de GAROGLIO et STELLA (1), qui a fait l'objet de plusieurs publications, est basée sur la coloration bleue que donne le réactif à la diphenylamine en présence de l'oxyméthylfurfural provenant du traitement chlorhydrique à chaud du saccharose. La méthode est plus précise et plus sensible que la méthode par inversion et permet, d'après les auteurs, de détecter 0,1 à 0,2 g de saccharose par litre. Cette méthode a fait l'objet de critiques et certains chercheurs ont noté des réactions positives dans des vins naturels (2).

Une méthode rapide de détection du saccharose pouvant être utilisée hors d'un laboratoire a été indiquée en 1959 par KOVATS et KOLTA (3). KOVATS et TORLEY (4) en 1961 et ASTEGIANO et MATTÀ (5) en 1962 ont amélioré la sensibilité de cette méthode qui utilise la réaction de RAYBIN, formation d'un composé vert bleuâtre à partir du saccharose en présence de diazo-uracile. L'addition de borate de sodium évite l'in-

terférence des sucres réducteurs. La sensibilité de cette méthode serait de 0,75 g par litre.

Il faut reconnaître que, malgré leurs grands mérites, ces méthodes colorimétriques n'apportent pas toujours à l'expert la certitude en matière de sucrage frauduleux. Lors des réunions de 1962 de l'Office International du Vin traitant de l'unification des méthodes d'analyses, il a été décidé à ce sujet: «La méthode GAROGLIO est acceptée à titre provisoire comme procédé usuel, à la condition que son utilisation soit confirmée qualitativement par chromatographie sur papier.» Il paraît difficile de retenir comme officielle une méthode qui demande confirmation par l'utilisation d'un autre procédé. Ces raisons nous ont incité à étudier l'application de la chromatographie à ce problème pour mettre au point une méthode simple de détection.

La chromatographie de partage sur papier des différents sucres est devenue d'utilisation courante dans les laboratoires de recherches (6). Elle a permis à GUICHARD (7), dès 1953, de reconnaître la présence de saccharose dans tous les raisins, les teneurs variant le plus souvent de 3 à 5 g par litre; certains cépages présentent des teneurs plus élevées. En employant une technique semblable, ASTEGIANO et GRAZIANO (8) ont trouvé du saccharose dans 15 variétés de raisin; la méthode de ces auteurs permettrait de déceler 250 mg de saccharose par litre.

Pour rechercher le saccharose dans les vins, DE FRANCESCO et AVANCINI (9) ont utilisé la méthode suivante: le vin est traité au préalable avec du noir animal et déminéralisé par un mélange d'échangeurs d'ions; on opère par chromatographie ascendante avec le butanol acétique comme solvant. On peut reconnaître ainsi la présence de 250 mg de saccharose par litre, en mélange avec des teneurs élevées de glucose et de fructose.

Il a été encore indiqué une méthode utilisant l'électrophorèse sur papier.

Partie Expérimentale

Choix d'un solvant.

On trouve dans la bibliographie la composition de nombreux solvants permettant la séparation chromatographique des sucres. Dans un précédent travail (10)

Tableau 1

Valeurs de Rf des Saccharose, Fructose et Glucose dans divers solvants

N ^{os} des Solvants	1	2	3	4	5	6	7
Saccharose	0,02	0,39	0,14	0,03	0,085	0,10	0,18
Glucose	0,07	0,30	0,18	0,09	0,15	0,19	0,27
Fructose	0,10	0,51	0,23	0,23	0,20	0,25	0,35

1. Butanol n, 50%; ammoniaque, 5%; eau distillée, 45%, GUICHARD (7).
2. Phénol, 50%; solution aqueuse d'ammoniaque à 1%, 50%; traces HCN, GUICHARD (7).
3. Butanol n, 40%; acide acétique, 10%; eau, 50%, LEDERER (6).
4. Butanol n, 50%; éthanol, 10%; eau, 40%, LEDERER (6).
5. Acétate d'éthyle, 9 parties; acide acétique, 2 parties; eau, 2 parties, JONAS (11).
6. Acétate d'éthyle, 40 parties; acide acétique, 20 parties; eau, 10 parties, JONAS (11).
7. Acétate d'éthyle, 6 parties; acide acétique, 3 parties; eau, 2 parties, JONAS (11).

nous avons obtenu une bonne séparation de dix sucres par chromatographie bidimensionnelle en utilisant comme premier solvant la phase organique du mélange n-butanol-acide acétique-eau dans les proportions en volume 4-1-6 et comme second solvant du phénol contenant 25% d'eau. Dans le cas présent, il est seulement nécessaire de séparer le saccharose des autres sucres, problème simple que nous avons résolu en chromatographie monodimensionnelle par utilisation d'un solvant monophasique de composition suivante: acétate d'éthyle-acide acétique-eau (6-3-2). Nous indiquons dans le tableau 1 la composition d'autres solvants permettant de bonnes séparations des saccharose, glucose et fructose.

Le solvant choisi donne de bons résultats même pour un rapport $\frac{\text{saccharose}}{\text{sucres réducteurs}}$ de $\frac{1}{200}$ avec un développement d'une dizaine d'heures, délai convenant à notre organisation de travail. S'il y a disproportion entre les quantités des sucres à séparer, le chromatogramme se trouve un peu trop «chargé», on observe une diminution de la valeur des Rf, et la séparation des sucres n'est obtenue que pour un long développement du chromatogramme. En choisissant un solvant à basse viscosité (cas de l'acétate d'éthyle), on obtient une vitesse d'écoulement assez rapide et la durée de développement en est réduite. ASTEGIANO et GRAZIANO (8) ont montré l'influence de la teneur en sucres réducteurs sur la séparation du saccharose dans le butanol acétique. Lorsque le rapport $\frac{\text{saccharose}}{\text{sucres réducteurs}}$ est de $\frac{1}{300}$, il est nécessaire de poursuivre le développement pendant 60 heures, tandis que pour un rapport de $\frac{1}{100}$, un délai de 48 heures réalise une bonne séparation.

L'influence des sucres réducteurs sur la séparation du saccharose a guidé notre choix pour le solvant à utiliser. Dans le tableau 2 sont consignées les valeurs de Rf du saccharose, en fonction de la teneur en sucres réducteurs présents avec deux solvants différents; la figure représente les chromatogrammes obtenus dans ces conditions.

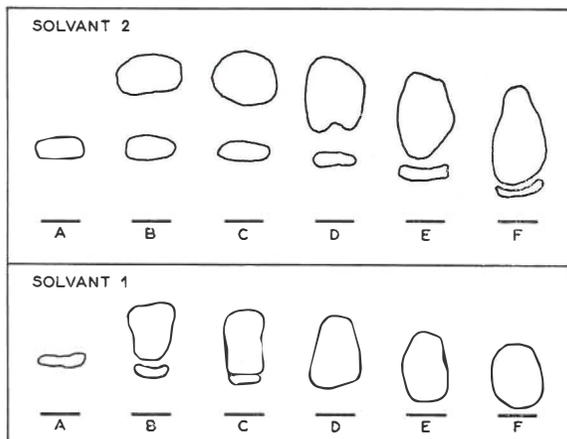
Choix d'un révélateur.

La sensibilité de la méthode dépend beaucoup de la technique de révélation employée. Les réactions des révélations utilisées pour les sucres sont nombreuses; elles s'appuient sur les propriétés spécifiques de certains groupes de glucides.

Tableau 2

Variation de la valeur de Rf du Saccharose suivant la teneur en sucres réducteurs de la solution
Chromatographie ascendante. Durée du développement: 9 heures

Désignation des solutions	Sucres réducteurs	Saccharose	Rf	
			Solvant 1	Solvant 2
A	0	1	0,14	0,18
B	25	1	0,12	0,18
C	50	1	0,09	0,16
D	100	1	—	0,14
E	150	1	—	0,11
F	200	1	—	0,09



Solvant 1: n-butanol, 4 parties; acide acétique, 1 partie; eau, 5 parties.

Solvant 2: acétate d'éthyle, 6 parties; acide acétique, 3 parties; eau, 2 parties.

GUICHARD (7) a utilisé un réactif à base de naphtorescincinol qui révèle le fructose et le saccharose en rouge. Ce réactif est obtenu en mélangeant à parties égales les deux solutions suivantes: solution à 2 g de naphtorescincinol par litre dans l'éthanol à 95% et solution aqueuse à 2 g d'acide trichloracétique par litre.

L'urée en milieu chlorhydrique, excellent réactif des cétooses et des polyosides en contenant, a été utilisée par ASTEGIANO et GRAZIANO (8); les spots obtenus sont bleu gris. La réaction est sensible, mais lorsque la teneur en glucose est élevée, une coloration grisâtre peut interférer avec celle du saccharose. Nous préférons utiliser un révélateur à base d'anthrone qui donne des spots plus nets, surtout dans le cas où la teneur en sucres réducteurs est élevée par rapport à la teneur en saccharose. Ce réactif est obtenu en dissolvant 200 mg d'anthrone dans 10 ml d'acide acétique, 3 ml d'acide phosphorique et 20 ml d'éthanol. On pulvérise ce révélateur à la surface du papier et on porte le chromatogramme 5 minutes dans une étuve à 105° C. Les cétooses et les polyosides en contenant donnent des taches jaune brillantes.

Nous avons également obtenu de bons résultats à l'aide du révélateur à l'acide thiobarbiturique préconisé par PERCHERON (12) pour les cétooses et les oses contenant du fructose. On dissout 500 mg d'acide thiobarbiturique dans 100 ml d'éthanol à 30° auquel on incorpore 2 ml d'acide phosphorique à 85%. Ce révélateur se conserve bien à la température ordinaire à l'abri de la lumière. Le saccharose apparaît sous forme de tache jaune orangé après chauffage à 100°—105° pendant 5 à 7 minutes.

Préparation de la solution à chromatographier.

Pour obtenir une bonne séparation des sucres sur papier, il est indispensable d'éliminer la plupart des autres substances se trouvant dans le milieu à analyser. Plusieurs techniques de purification ont été décrites. L'utilisation de colonnes de résines échangeuses d'ions donne de bons résultats, mais les manipulations sont longues, aussi avons-nous cherché ici à éviter leur emploi.

ASTEGIANO et GRAZIANO (8) préparent la solution à chromatographier de la façon suivante: dans une fiole jaugée de 25 ml, placer 20 ml de moût, 1 ml d'acétate basi-

que de plomb et 100 mg de charbon décolorant; mélanger, porter à 25 ml et filtrer; la chromatographie est effectuée sur 20 ml du filtrat.

Après plusieurs essais sur des vins et des moûts nous avons constaté qu'en traitant simplement 50 ml de liquide par 200 mg de charbon décolorant et en filtrant, on obtenait des résultats satisfaisants. De même la défécation par l'acétate de plomb et l'élimination de l'excès de plomb par un échangeur de cations permettent d'obtenir des chromatogrammes très lisibles.

Les sucres réducteurs pouvant gêner la séparation du saccharose, nous avons pensé les éliminer en milieu alcalin ainsi qu'il est d'usage avant l'application d'une méthode chimique. Dans ce but GAROGLIO et STELLA (1) utilisent le chauffage en présence de magnésie, d'acétate de plomb et de permanganate de potassium. Les solutions étendues de potasse ont été également préconisées, ainsi que l'oxydation par l'eau oxygénée en milieu alcalin. Nous avons essayé ces techniques sur des solutions de glucose et de fructose à 100 g par litre. Le pourcentage de sucre éliminé est indépendant de la nature du sucre; il est de 50% par action du mélange magnésie, acétate de plomb, permanganate, ainsi qu'avec la potasse; l'eau oxygénée en milieu alcalin n'élimine que 25% des sucres. Après ces traitements, il est indispensable de fixer les cations sur une résine échangeuse d'ions.

Mode opératoire de la méthode utilisée pour la recherche du saccharose.

Suivant la teneur en sucres réducteurs du vin ou du moût nous utilisons les techniques suivantes:

Vins et moûts contenant moins de 150 g de sucres réducteurs par litre: à 50 ml de vin ou de moût, on ajoute 200 mg de charbon décolorant; on agite et on filtre après quelques instants sur filtre plissé. Ce vin décoloré servira directement à la chromatographie.

Vins et moûts contenant plus de 150 g de sucres réducteurs par litre: à 20 ml de liquide, on ajoute 2 ml de solution de potasse à 10% et on porte 10 minutes à 100° C. On refroidit et on ajoute 3 à 4 ml de Dowex 50 (H⁺) de 200-400 mesh. On agite quelques minutes et on filtre. La résine déminéralise et fixe la matière colorante brunâtre. La chromatographie est effectuée sur le filtrat.

A 3 cm de la base d'une feuille de papier Arches 302, on dépose 50 μ l de la solution déféquée sous forme d'un trait de 2 cm. Le papier est ensuite placé verticalement dans une cuve à chromatographie, sa base plongeant de 1 cm environ dans le solvant. Au bout d'une dizaine d'heures, le solvant, montant par capillarité, a parcouru 25 à 30 cm, distance suffisante pour réaliser une bonne séparation. Le papier est ensuite retiré de la cuve et séché sous une hotte ventilée. La révélation est effectuée pendant 5 minutes à 105° C après pulvérisation du réactif à base d'anthrone.

Si l'on désire obtenir une estimation de la teneur en saccharose, on peut comparer l'importance du spot avec ceux obtenus à partir de solutions contenant des quantités croissantes connues de saccharose et présentant une teneur en sucres réducteurs assez voisine de celle de l'échantillon à analyser.

On peut ainsi estimer 200 mg de saccharose par litre. Le résultat est obtenu le deuxième jour.

Application de la méthode.

On sait que le saccharose ajouté s'hydrolyse spontanément dans le moût et dans le vin, d'une part sous l'influence des ions H⁺, d'autre part sous l'action de la

Tableau 3

Vitesse d'hydrolyse du Saccharose dans les vins
Addition de 10 g de saccharose par litre.

Vin	Saccharose restant après		
	6 jours	14 jours	20 jours
Vins blancs secs			
No 1 1959	7	4	2
No 2 1959	0	0	0
No 3 1961	0	0	0
Vins blancs liquoreux			
No 1 1959	4	3	1
No 2 1959	2	1	0

saccharase provenant des cellules du raisin et des cellules des levures. L'hydrolyse diastasique est, de loin, la plus importante, même dans des vins âgés de 5 ou 6 ans, et il n'est pas rare d'observer la transformation d'une vingtaine de grammes de saccharose par litre en une ou deux semaines (13). Nous avons suivi l'hydrolyse spontanée du saccharose dans différents vins additionnés de 10 g par litre. Le tableau 3 indique quelques exemples des résultats obtenus. Si dans deux vins le saccharose ajouté a complètement disparu en 6 jours, il en reste encore des quantités dosables après 20 jours dans deux autres vins.

L'efficacité de la recherche de l'édulcoration frauduleuse des vins avec du saccharose dépend donc surtout du temps écoulé entre l'addition et l'analyse de contrôle. Bien entendu la neutralisation de l'acidité et l'inactivation de la saccharase, selon la technique décrite par JAULMES (14), par PORTAL (15) et collaborateurs, s'imposent chaque fois que le sucrage est soupçonné. Il sera nécessaire alors de déminéraliser le liquide par un peu de résine cationique avant de chromatographier. La moindre trace de saccharose trouvée dans un vin est la preuve formelle qu'il y a eu addition étrangère. Précisons enfin que les sirops de sucre intervertis par chauffage en présence d'acide tartrique, contiennent encore le plus souvent une petite proportion de saccharose, facilement détectée dans des vins ainsi enrichis.

Résumé

La chromatographie de partage sur papier nous a permis de mettre au point une technique spécifique très sensible de recherche du saccharose dans les moûts et les vins. En raison de la présence de saccharase, l'efficacité de la recherche du sucrage basée sur cette méthode est conditionnée par la rapidité du prélèvement et de l'exécution du dosage.

Références bibliographiques

- (1) P. G. GAROGLIO et C. STELLA: *Rivista Vitic. Enol.* 8, 155 (1955); 8, 385 (1955).
- (2) E. KIELHÖFER u. H. AUMANN: *Wein u. Rebe in Dt. Weinztg.*, 38 (1) (1956).
- (3) T. KOVATS et L. KOLTA: Dosage rapide du saccharose dans le moût et le vin. *Ann. Falsif. Exp. Chim.* 52, 311 (1959).

- (4) T. KOVATS et D. TORLEY: Contribution au dosage rapide du saccharose dans le moût et le vin. *Ann. Falsif. Exp. Chim.* 54, 236 (1961).
- (5) V. ASTEGIANO et M. MATTA: Sulla ricerca del saccarosio nei mosti. *Riv. Vitic. Enol.* 4, 107 (1962).
- (6) E. LEDERER et coll: *Chromatographie en chimie organique et biologique*. Masson, Paris (1960).
- (7) C. GUICHARD: Contribution à l'étude des glucides de la vigne et de certains fruits. Thèse Sciences, Bordeaux (1953).
- (8) V. ASTEGIANO et M. T. GRAZIANO: Sulla presenza di saccarosio nell'uva. *Atti Accad. ital. Vite Vino* 10, 614 (1958).
- (9) F. DE FRANCESCO et D. AVANCINI: Micro-ricerca cromatografica del saccarosio nei vini. *Boll. Lab. Chim. Bologna* 11, 385 (1960).
- (10) E. PEYNAUD, G. GUIMBERTEAU et S. DOMERCO: Die Anwendung der Zucker-Chromatographie zur Charakterisierung der Milchsäurebakterien im Wein. *Mitt. Klosterneuburg*, A 12, 183 (1962).
- (11) J. JONAS: Dosage du lactose en mélange avec d'autres sucres. *J. Pharmacie Belgique* 15, 119 (1960).
- (12) F. PERCHERON: Emploi d'un réactif à l'acide thiobarbiturique pour la révélation des cétooses sur les chromatogrammes. *Bull. Soc. Chim. biol.* 44, 1161 (1962).
- (13) J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD: *Analyse et Contrôle des vins*. 2e éd., Béranger, Paris (1958).
- (14) P. JAULMES, G. HAMELLE et A. BONNET: La recherche du sucrage des moûts. *Ann. Falsif. Exp. Chim.* 54, 124 (1961).
- (15) E. PORTAL et A. BONNET: Sur la recherche du sucrage dans les moûts et les vins. *Bull. int. Doc. Serv. Répression des Fraudes*. 1, L6 (1961).

Eingegangen am 23. 6. 1964

Prof. Dr. E. PEYNAUD
Stat. Agronomique et Oenologique
de Bordeaux
Talence (Gironde)