

## ESTIMATION DU DEGRÉ DE POLYMÉRISATION DES PROCYANIDINES DU RAISIN ET DU VIN PAR LA MÉTHODE AU *p*-DIMETHYLAMINOCINNAMALDÉHYDE

N. VIVAS\*, Y. GLORIES, Laure LAGUNE\*\*, C. SAUCIER\*\*\* et Monique AUGUSTIN

Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II,  
351, cours de la Libération, 33405 Talence (France)

**Résumé:** Les auteurs proposent une nouvelle technique d'estimation du degré de polymérisation des tanins du raisin et du vin, utilisant un aldéhyde spécifique des structures phénoliques renfermant des noyaux phloroglucinols ; la *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACH). Cet aldéhyde est utilisé pour la première fois pour la détermination du degré de condensation des procyanidines. L'indice obtenu avec cet aldéhyde est d'autant plus faible que le degré de polymérisation des tanins est élevé. Le protocole retenu permet de réaliser des mesures avec un coefficient de répétabilité moyen de 5 p. cent (au seuil de confiance  $\alpha = 95$  p. cent). La méthode permet, d'une part d'estimer le degré de polymérisation moyen des procyanidines et d'autre part de mesurer l'influence de certaines pratiques (consommation de l'oxygène dissous, ajout d'acétaldéhyde, supplémentation en extrait phénolique) sur la variation du degré de condensation moyen des tanins.

### INTRODUCTION

Les tanins du raisin et du vin sont des molécules de structure plus ou moins complexe constituées de procyanidines. Elles correspondent à une succession d'unités élémentaires de flavanol-3 ; le plus fréquemment, il s'agit de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine (LEA et al., 1979 ; HASLAM, 1980). Ces tanins contribuent à la couleur (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1964 ; RIBÉREAU-GAYON et al., 1983) et aux caractères organoleptiques des vins rouges (BATE-SMITH, 1956). Le degré de polymérisation des procyanidines est en relation avec les impressions gustatives et en particulier la sensation d'astringence (HASLAM et LILLEY, 1988 ; ROBICHEAU et NOBLE, 1990).

On doit à GLORIES (1971) les premières déterminations de la masse moléculaire moyenne des tanins de raisins et de vins, par microcryométrie. Cette méthode, relativement délicate a été complétée, quelques années plus tard, par une estimation plus simple de l'état de polymérisation des tanins condensés (GLORIES, 1978) basée sur leur insolubilisation en milieu acide (indice d'HCl) ; plus le degré de polymérisation des tanins est élevé et plus la quantité de précipité formé, en milieu acide, est importante ; les valeurs de l'indice ont été corrélées aux résultats de la microcryométrie.

\* : Tonnellerie DEMPTOS S.A., détaché à l'Institut d'Œnologie,

\*\* : Groupe SARCO, détaché à l'Institut d'Œnologie,

\*\*\* : CNRS centre Paul Pascal, détaché à l'Institut d'Œnologie

La technique de FAB/MS (Bombardement avec des Atomes Rapides couplé à la Spectrométrie de Masse, SELF et *al.*, 1986) ou la LSIMS (Spectrométrie de Masse des ions secondaires en phase Liquide, VIVAS et *al.*, 1994) permettent de déterminer la masse moléculaire des groupes de composés majoritaires d'un mélange. Mais ces techniques sont délicates et font appel à un appareillage lourd qui ne se prête pas à l'analyse de routine. La thiolysse de tanins condensés suivie de l'analyse des produits formés par CLHP (RIGAUD, et *al.*, 1991) permet d'accéder au degré de polymérisation (D.P.), qui correspond au nombre moyen d'unité élémentaire constituant les tanins ; cependant la méthode nécessite des étapes de fractionnement, de dérivation et d'analyse CLHP qui la rendent relativement longue. RIGAUD et *al.* (1993) fractionnent directement les tanins condensés de raisin, en fonction de leur masse moléculaire, par CLHP en phase normale sur colonne de Silice (Lichrospher Si100). La méthode proposée ne demande ni de dérivation préalable, ni de préfractionnement, mais elle n'est pas adaptée aux formes les plus polymérisées ( $n > 5$  ; PRIEUR et *al.*, 1994). Récemment PRIEUR et *al.* (1994) ont utilisé la chromatographie de perméation de gel pour déterminer la masse moléculaire des procyanidines oligomères et polymères des raisins. Cette technique est relativement longue et nécessite un fractionnement préalable de l'extrait suivi d'une péricétylation des procyanidines ; elle se prête donc difficilement à l'analyse en série. L'ensemble de ces méthodes donnent des valeurs moyennes de la masse moléculaire ( $M_r$ ) ou du degré de polymérisation (D.P.) des tanins du raisin ou du vin, mais elles restent, pour la plupart, difficilement utilisables dans les analyses courantes de laboratoire. Une méthode donnant un indice de l'état de polymérisation des tanins condensés du raisin et du vin, applicable directement sur l'extrait total ou sur le vin, apparaît comme une démarche intéressante et complémentaire.

La réactivité des sommets nucléophiles des noyaux phloroglucinol avec les aldéhydes protonés est une propriété connue depuis longtemps. Des méthodes, utilisant ce principe, peuvent donner des indications sur le mode de condensation et l'encombrement stérique des polymères de procyanidines. Avec l'aldéhyde formique, on obtient un complexe qui précipite (SINGLETON, 1974) et avec la vanilline, le complexe formé est soluble, de couleur rouge (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1964 ; RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1976). Plus le degré de polymérisation des procyanidines est élevé, moins les sites nucléophiles des tanins sont accessibles à l'aldéhyde. Dans le cas de réaction colorée, l'intensité de la couleur est d'autant plus faible que le degré de condensation des tanins est élevé. Ainsi on peut supposer que :

- Dans le cas de polymérisations hétérogènes, par l'intermédiaire de ponts éthanal (DOURNEL, 1985 ; GALVIN, 1993) conduisant à des structures ramifiées (GLORIES, 1987), l'accessibilité des sites nucléophiles des tanins diminue rapidement. La valeur des indices utilisant les aldéhydes comme réactif devient alors très faible.

- Dans le cas de condensations homogènes, de type "C4-C8" ou "C4-C6" (GLORIES, 1978), les sites nucléophiles restent plus facilement accessibles et la valeur de ces indices varie alors plus faiblement.

La réaction dépend de l'aldéhyde choisi. L'éthanal et le méthanal donnent rapidement des complexes stables, mais sans coloration, qui précipitent au cours du temps (GLORIES, 1974). La vanilline, en milieu acide donne des complexes rouges (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1964), mais cet aldéhyde paraît assez peu spécifique (SARKAR et HOWARTH, 1976) et le développement de la réaction est peu reproductible (THIES et FISHER, 1971). Le *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACH) semble être par contre, plus spécifique des noyaux phloroglucinols qui font partie de la structure des procyanidines du raisin et du vin (MURROUGH et DOWELL, 1978). Ce dernier aldéhyde peut être utilisé pour la détermination de l'état de condensation des procyanidines (NAGEL et GLORIES, 1991).

Nous présentons dans ce travail, une étude sur la spécificité de la réaction et sur les conditions d'emploi de cet aldéhyde pour l'estimation du degré de condensation des procyanidines du raisin et du vin.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### I — MATÉRIEL

Le *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACH) est fourni par MERCK™. L'ensemble des solvants utilisés sont de qualité RP.

Les composés phénoliques servant à tester la méthode proviennent soit du commerce : catéchine, phloroglucinol (FLUKA™), acides phénols, phénols simples (MERCK™ et SIGMA™), malvidine monoglucoside (EXTRASYNTHÈSE™), soit ont été purifiés à partir de matériels végétaux (raisin, chêne) ou de vins rouges. Les anthocyanes libres proviennent d'extraits hydroalcooliques de pellicules de Merlot noir à maturité (GLORIES, 1978). Les ellagitanins sont purifiés à partir d'un extrait à l'eau de chêne *Quercus robur* (VIVAS et al. 1991). Les différentes classes de tanins condensés sont fractionnées à partir de vins rouges jeunes (GLORIES, 1978). Le pentagalloylglucose nous a été gracieusement fourni par SCALBERT (INRA/INA, Paris-Grignon). Par ailleurs, la procyanidine B3 a été produite par hémisynthèse et isolée sur colonne de Sephadex LH-20 (JOURNEL, 1985).

### II — ORIGINE DES ÉCHANTILLONS DE RAISINS ET DE VINS ROUGES

#### 1°) Échantillons de raisins

Des baies de raisins de plusieurs cépages Bordelais ont été prélevées en 1992 à la maturité industrielle (maximum de sucres) dans les collections ampélographiques de la Chambre d'Agriculture de la Gironde (Blanquefort). Les pellicules et les pépins ont été séparés, puis mis à macérer dans un milieu hydroalcoolique (10 p. cent vol., pH= 3,5) à 20°C pendant 72 heures à raison de 1 g de matière fraîche pour 100 ml de solution d'extraction. Les analyses sont pratiquées sur les solutions filtrées.

## 2°) Échantillons de vins

### a) Fractionnement des différentes classes de tanins

Les différentes classes de tanins (procyanidines oligomères, C,P ; combinaisons tanins-anthocyanes, TA ; tanins condensés, TC ; tanins très condensés, Ttc et combinaisons tanins-polysaccharides, TP) sont isolées à partir de 5 l d'un vin de l'année de Cabernet sauvignon (GLORIES, 1978). Pour comparer les résultats obtenus, nous avons utilisé les TC d'un vin du même cépage après 18 mois d'élevage en barriques et les TC et TP d'un vin conservé 5 ans en bouteilles (millésime 1987).

### b) Tests de reproductibilité de la méthode

Nous utilisons des vins jeunes : 2 vins du Médoc de Cabernet sauvignon, 3 vins de Saint-Emilion de Merlot noir. Les analyses ont été pratiquées 15 jours après la fermentation malolactique.

### c) Étude de l'influence de certains facteurs

L'étude a été pratiquée sur 3 vins rouges de Merlot noir (Saint-Emilion) de l'année ; 2 vins de goutte et 1 vin de presse. L'essai de comparaison des indices HCl et DMACH/LA a été pratiqué sur 8 vins de Merlot noir (Saint-Emilion) conservé 3 ans en bouteilles (millésime 1988).

### d) Application de la méthode à différents vins

La détermination de l'indice DMACH/LA a été réalisée sur 8 vins rouges français du commerce issus de 3 millésimes (1990, 1992, 1993) et de 4 A.O.C. (Anjou, Saint-Emilion, Médoc, Madiran).

## III — DOSAGE ET MESURE DES INDICES CARACTÉRISTIQUES DE LA STRUCTURE DES TANINS

Le dosage des tanins totaux (tanins "LA") est réalisé selon la méthode décrite par RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1964). Les phénols totaux sont déterminés par mesure de l'absorbance à 280 nm. L'indice d'HCl et l'indice de dialyse sont mesurés dans les conditions mises au point par GLORIES (1978). Ces deux indices expriment respectivement le niveau de polymérisation et l'encombrement stérique des tanins.

## IV — MÉTHODE D'ESTIMATION DU DEGRÉ DE CONDENSATION DES PROCYANIDINES PAR LA MÉTHODE AU p-DIMETHYLAMINOCINNAMALDÉHYDE

### 1°) Préparation du réactif

Il s'agit d'un mélange contenant l'aldéhyde DMACH dont la composition est adaptée à partir des travaux de THIES et FISHER (1971). La préparation du réactif comprend la solubilisation de 100 mg de l'aldéhyde dans 10 ml d'acide chlorhydrique (12 N), pour obtenir à la fois un milieu suffisamment acide et concentré.

La solution chlorhydrique doit ensuite être diluée dans un alcool. L'éthanol et l'isopropanol ne permettent pas d'obtenir une stabilisation rapide de la couleur. En revanche, les résultats obtenus avec le méthanol sont beaucoup plus satisfaisants. D'autre part, cette solution méthanolique reste stable et utilisable pendant une dizaine de jours. Donc, la solution chlorhydrique est ajustée à 100 ml par du méthanol et constitue le réactif DMACH.

## 2°) Conditions de la réaction

On constate que l'eau modifie le spectre visible de la réaction (effet bathochrome) et diminue sensiblement la reproductibilité des mesures. Les échantillons de vins ou d'extraits de pépins et de pellicules doivent alors être dilués au 1/20 (v/v) dans du méthanol.

Dans un tube à essai, on mélange à 1 ml de la solution diluée (vins, extraits de pellicules ou de pépins) 5 ml du réactif DMACH, on laisse réagir pendant 10 minutes et on effectue la mesure à 640 nm (figure 1) sous un parcours optique de 1mm (d1).

En raison de l'absorption à cette longueur d'onde, des vins rouges et des extraits de pellicules de cépages noirs, un témoin est réalisé dans les mêmes conditions, le réactif étant remplacé par du méthanol (d2). L'absorbance de la mesure correspond à la différence entre ces deux valeurs de D.O. :

$$d \text{ DMACH} = (d1-d2) \times 10 \quad (1)$$

Pour obtenir une expression permettant d'accéder à des résultats en rapport avec le degré de polymérisation des tanins condensés, nous proposons, par analogie avec le rapport V/LA (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1964), le rapport :

$$\text{DMACH/LA} = (d \text{ DMACH/LA}) \times 100 \quad (2)$$

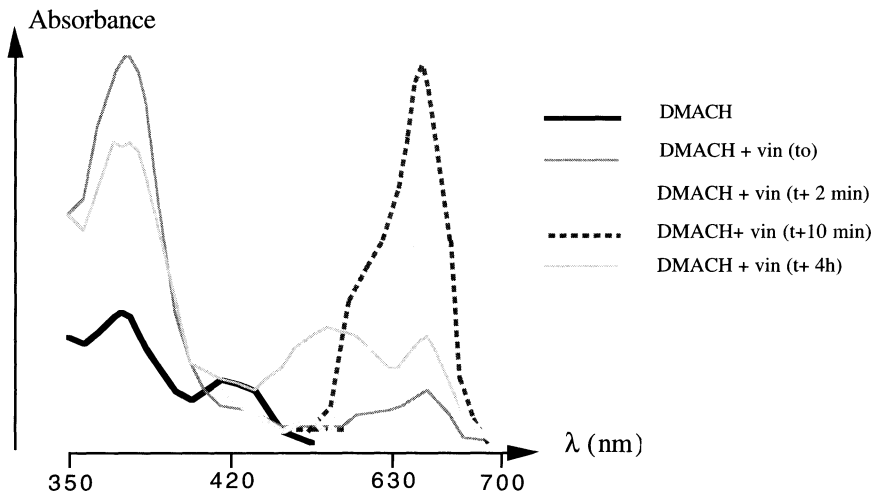


Fig. 1 — Spectre visible du développement de la réaction colorée entre les tanins du vin et le DMACH

## RÉSULTATS

### I — ÉTUDE DE LA SPÉCIFICITÉ ET DE LA REPRODUCTIBILITÉ DE LA RÉACTION COLORÉE

Sur le plan général, l'aldéhyde étudié ne réagit pas avec les noyaux crésol, pyrocatéchol et hydroquinone (figure 2). Ces structures sont caractérisées soit par un groupe hydroxy (crésol), soit par deux groupes en position *ortho* (catéchol) ou *para* (hydroquinone). Par contre, les noyaux résorcinol (2 OH en *méta*) réagissent avec l'aldéhyde (figure 2), mais la réaction colorée demande plusieurs heures pour se développer. En revanche, les noyaux phloroglucinols (3 OH en *méta*, figure 2) réagissent rapidement et la couleur obtenue est intense. Cet aldéhyde présente donc une remarquable spécificité à l'égard des noyaux phloroglucinols représentant une partie des structures flavanoliques des tanins du raisin et du vin (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1964 ; GLORIES, 1971).

En ce qui concerne les composés phénoliques du raisin et du vin, la réaction de l'aldéhyde DMACH est testée, en présence de différents groupes de composés purs. Les résultats se rapportant aux acides phénols, aux flavanols, aux procyanidines et aux anthocyanes monoglucosides sont regroupés dans le tableau I :

- Les acides-phénols ne réagissent pas avec l'aldéhyde, dans les conditions retenues. Ces résultats sont en relation avec le mode de substitution du noyau benzénique de ces molécules, incompatible avec la fixation de l'aldéhyde DMACH.

- La malvidine monoglucoside ne présente qu'une réaction faible. Elle est le résultat de la neutralisation partielle des charges négatives en 6 et 8 de la molécule, en relation avec le déficit électronique de l'hétérocycle oxygéné, sous forme oxonium en milieu acide (GLORIES, 1984a).

- Les catéchines et les procyanidines réagissent avec l'aldéhyde. L'intensité de la réaction est la plus importante avec les flavanols monomères (catéchine, epicatechine) et plus faible avec les flavanols dimères (procyanidine B3).

Les ellagitanins, susceptibles de se solubiliser au cours de l'élevage des vins sous bois (MOUTOUNET et al., 1993), et les gallotanins apportés sous forme de tanins œnologiques (VIVAS et al., 1993a et b), ne développent pas de coloration spécifique en présence d'aldéhyde DMACH.

Ainsi, dans les vins rouges et les extraits de pellicules et de pépins, seules les molécules présentant des noyaux phloroglucinols sont capables de réagir avec l'aldéhyde DMACH. Les interférences liées aux acides-phénols, aux tanins hydrolysables et même aux anthocyanes sont négligeables.

Les résultats obtenus sur les différentes fractions phénoliques isolables de vins rouges par la méthode mise au point par GLORIES (1978), sont regroupés dans le tableau II. Les valeurs du rapport DMACH/LA varie de 10 à 200, en sens inverse de la masse moléculaire estimée des différentes fractions phénoliques, selon une relation du type :  $DMACH/LA = f(1/Mr)$ .

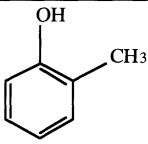
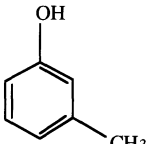
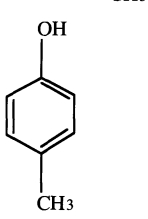
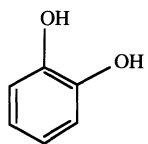
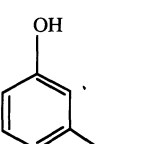
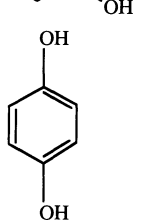
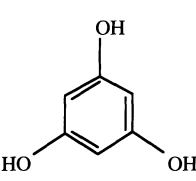
<b>PHENOLS MONOHYDROXYLES</b>		<b>Réaction avec le DMACH</b>
<i>o</i> - monophénol ( <i>o</i> - crésol)		Négative
<i>m</i> - monophénol ( <i>m</i> - crésol)		Négative
<i>p</i> - monophénol ( <i>p</i> - crésol)		Négative
<b>PHENOLS DIHYDROXYLES</b>		
<i>o</i> - diphénol (pyrocatechol)		Négative
<i>m</i> - diphénol (résorcinol)		Faible et lente
<i>p</i> - diphénol (hydroquinone)		Négative
<b>PHENOL TRIHYDROXYLE</b>		
<i>m</i> - triphénol (phloroglucinol)		Positive

Fig. 2 — Influence de la substitution des noyaux benzéniques sur la réaction au DMACH

**TABLEAU I**  
**Spécificité de la réaction colorée au DMACH**

Molécules testées*	Noms	DO 640 nm (l=1cm)
Acides phénols	acide gallique	0
	acide ellagique	0
	acide sinapique	0
	acide vanillique	0
	acide férulique	0
	acide caféïque	0
	acide syringique	0
	acide protocatéchique	0
Flavanols	(+)-catéchine	1,2
	(-)-épicatéchine	1,8
Procyanidines dimères	procyanidine B3	0,78
Ellagitanins	castalagine	0
	vescalagine	0
Gallotanins	pentagalloyl-glucosé	0
Anthocyanes	malvidine-3-monoglucoside	0,008

\*: en solution à 1 g/l en milieu hydroalcoolique à pH 3,5

Les procyanidines oligomères ont un indice compris entre 100 et 200, pour les tanins condensés, il est de 50 et pour les tanins très condensés il varie de 10 à 20. Lorsque le degré de condensation augmente, la valeur de DMACH/LA diminue. Dans la limite de masse moléculaire moyenne (Mr) compris entre 1000 et 3000 Da, la relation liant l'indice DMACH/LA à Mr est linéaire. D'après les travaux de RIBÉREAU-GAYON et GLORIES (1971) puis de GLORIES et RIBÉREAU-GAYON (1973), ces valeurs (1000 < Mr < 3000) correspondent à la masse moléculaire moyenne des tanins du raisin et du vin. Dans ces limites, le protocole retenu est adapté à l'estimation du degré de condensation des tanins de ces milieux.

La reproductibilité de la méthode a été étudiée sur 5 vins rouges (2 vins du Médoc et 3 vins de Saint-Emilion) du millésime 1992. Le dosage des tanins et la mesure du rapport DMACH/LA ont été répétés 6 fois. Les résultats obtenus (tableau III) montrent une très bonne réponse de la méthode. Le coefficient de variation demeure inférieur à 2 p. cent, la répétabilité au seuil de confiance [ $\alpha$ ] de 95 p. cent se situe à 5 p. cent. Il est alors possible d'estimer le niveau de condensation des tanins avec une bonne reproductibilité.

TABLEAU II

Incidence des composés phénoliques isolés de vins rouges sur la réaction colorée avec le DMACH

Fractions isolées	Composition	PM(1)	Poids échantillon g/l	Tanins "LA" g/l	d 280	DMACH/LA
Al	Anthocyanes libres	500	0,1*	0	1	/
C,P	Procyanidines oligomères, flavanols	600	1*	0,68	14	191
TA	Combinaisons tanins-anthocyanes	1000-2000	1*	0,08	1	8,8
TC	Tanins condensés	2000-3000	1* 1** 1***	0,62 0,06 0,18	11 1 3	44,8 53,3 37,6
Ttc	Tanins très condensés	3000-5000	1*	0,5	4	15,8
TP	Combinaisons Tanins-polysaccharides	>5000	1* 3***	0,14 0,21	1 3	17,9 19,6

1 : Poids moléculaire moyen, d'après GLORIES (1980)

\*: vin jeune de Cabernet sauvignon

\*\* : vin élevé 18 mois en barriques neuves

\*\*\*: vin conservé 5 ans en bouteilles

**TABLEAU III****Reproductibilité de la détermination du degré de condensation des procyanidines par la méthode au DMACH**

(Échantillons : 2 vins rouges du Médoc A,B ; 3 vins rouges de Saint émilion C,D,E du millésime 1992)

Répétition	Echantillons				
	A	B	C	D	E
1	61,05	66,78	64,82	76,4	58,72
2	64,21	70	76,07	75	55,89
3	61,31	67,85	75	75,46	57
4	61,05	67,85	77,5	72,65	58,31
5	60,5	68,21	73,21	72,34	56,76
6	59,21	68,75	76,07	77,68	57,43
Moyenne	61,22(±1,25)	68,24(±0,75)	75,44(±1,10)	74,92(±1,61)	57,35(±0,8)
Ecart type	1,5	0,98	1,32	1,91	0,95
cv (%)*	1,67	1,1	1,46	2,16	1,39
z (%) **	5,48	3,5	4,27	6,22	4,04

\* : coefficient de variation

\*\* : coefficient de répétabilité pour un degré de confiance de 95 p. cent

**II — APPLICATION DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE DE LA DÉFINITION DE L'ÉTAT DE POLYMÉRISATION DES TANINS CONDENSÉS**

Des réactions et certains produits permettent de modifier le degré de polymérisation des tanins des vins ou de solutions modèles. Leur étude doit permettre de compléter l'interprétation du mode d'action de cet aldéhyde sur les noyaux phloroglucinols. Nous envisageons successivement de préciser l'incidence sur la structure des composés phénoliques des réactions d'oxydation, de la présence d'éthanal et d'une supplémentation en catéchine et en tanins très condensés.

## 1°) Incidence des réactions d'oxydation

## a) Consommation d'oxygène dissous

La consommation d'oxygène aboutit, par le mécanisme d'oxydation couplé décrit par CHAPON et CHAPON (1977), à des condensations de composés phénoliques qui font intervenir l'éthanal comme agent de liaison (DURNEL, 1985 ; GLORIES, 1987).

On observe dans le tableau IV que la consommation de 16 mg d'oxygène par litre conduit à la diminution du rapport DMACH/LA de solution hydroalcoolique de catéchine et de certains vins (échantillons 2 et 3 du tableau IV), traduisant une augmentation du degré de condensation des tanins.

**TABLEAU IV****Incidence des réactions oxydatives sur la valeur de l'indice DMACH/LA**

Analyse après consommation de 16 mg/l d'oxygène

DMACH/LA	Solutions modèles		Vins rouges		
	catéchine (1g/l)	tanins très condensés (1g/l)	1	2	3
Temps = 0	102	42	59	52	65
Temps t+72 heures	71	58	76	38	50

On observe également une augmentation du rapport DMACH/LA de solution hydroalcoolique de tanins très condensés et de vin (échantillon 1 du tableau IV), qui révèle une diminution du degré de condensation des tanins. Dans le premier cas, la fraction oligomérique des tanins est majoritaire (solution de catéchine et vin 2 et 3 du tableau IV) et l'augmentation du degré de condensation est compatible avec leur maintien en solution vraie. Dans le deuxième cas, les tanins déjà très polymérisés (solution de tanins très condensés et vin 1 du tableau IV) conduisent, après condensation oxydative, à la formation de polymères précipitant en partie. D'ailleurs les échantillons, se caractérisant par une augmentation du rapport DMACH/LA, présentent à la fois une diminution du résultat du dosage des tanins et des précipités de tanins plus ou moins abondants dans le fond des flacons. Il convient de préciser, pour compléter l'explication du comportement différent des vins, que l'échantillon 1 possède des tanins à la fois très polymérisés (indice d'HCl = 23) et très encombrant (indice de dialyse = 34), au contraire des échantillons 2 et 3 qui ont un indice d'HCl respectivement de 12 et 15, et un indice de dialyse de 17 et 13. L'échantillon 1 est un vin de presse très chargé et les échantillons 2 et 3 sont des vins de goutte.

## b) Ajout d'éthanal dans une solution de (+)-catéchine

L'ajout d'éthanal, directement dans une solution hydroalcoolique (pH = 3,2) de catéchine, favorise les réactions de condensation de type BAYER (GLORIES, 1990) conduisant à des tanins très encombrants du type catéchine-éthanal-catéchine. Comme pour l'expérience précédente, la formation de ces tanins provoque une baisse du rapport DMACH/LA (figure 3) par diminution de l'accessibilité des sites nucléophiles actifs (sommets 6 et 8 de la catéchine).

## 2°) Incidence de la supplémentation de vins rouges en (+)-catéchine et en extraits de tanins très condensés

La supplémentation d'un vin rouge, soit en catéchine, soit en tanins très condensés, modifie le degré de polymérisation moyen des tanins du vin. Cette addition doit avoir une action sur l'intensité de la réaction avec l'aldéhyde étudié.

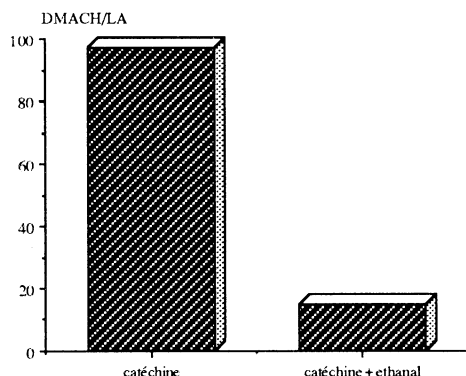


Fig. 3 — Incidence de l'éthanal sur la valeur du rapport DMACH/LA d'une solution de catéchine (solution hydroalcoolique 12 p. cent EtOH pH = 3,2 ; analyse 24 h après incubation à 30°C en présence de 100 mg/l d'éthanal)

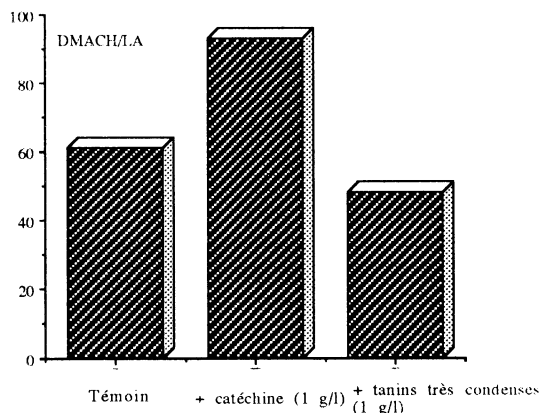


Fig. 4 — Incidence de l'ajout de catéchine et de tanins très condensés sur la valeur du rapport DMACH/LA d'un vin rouge

La figure 4 montre d'une part, que l'ajout de catéchine augmente bien le rapport DMACH/LA et traduit une diminution du degré de polymérisation moyen des tanins du vin (la différence est de +32 en valeur absolue) et d'autre part, que l'ajout de tanins très condensés diminue la valeur du rapport DMACH/LA, lié à une augmentation du degré de polymérisation moyen des tanins du même vin (la différence est de -13 en valeur absolue).

3°) Mesure du rapport DMACH/LA d'extraits de pépins et de pellicules de plusieurs cépages noirs du Bordelais

Les résultats concernant la mesure du rapport DMACH/LA sur des extraits de pépins et de pellicules de plusieurs cépages du millésime 1992 sont rassemblés dans le tableau V. On constate que DMACH/LA est dans les pellicules trois à quatre fois plus faible que dans les pépins, quel que soit le cépage.

Ces résultats confirment des données récentes (GLORIES et AUGUSTIN, 1992) considérant que les tanins de pépins sont moins polymérisés que ceux des pellicules.

**TABLEAU V**

**Indice DMACH/LA d'extraits de pellicules et de pépins  
de divers cépages bordelais à maturité (millésime 1992)**

(Extraction en milieu hydroalcoolique, 72 heures à 20°C)

	DMACH/LA	
	pellicules	pépins
Merlot noir	20,4	78,5
Cabernet sauvignon	17,7	81,0
Cabernet franc	21,4	62,7
Carmenère	30,5	92,7
Petit verdot	25,1	101,0

4°) Mesure du rapport DMACH/LA de vins rouges : comparaison avec les indices d'HCl et de dialyse

Les mesures de DMACH/LA réalisées sur plusieurs vins rouges de cépages et millésimes différents sont regroupées dans le tableau VI. Les valeurs sont comprises entre 20 et 70. Nous avons simultanément mesuré sur les mêmes vins d'une part, l'indice d'HCl représentant une estimation du degré de polymérisation moyen des tanins (GLORIES, 1974, 1978) et d'autre part, l'indice de dialyse exprimant l'encombrement stérique des tanins (GLORIES, 1978).

L'utilisation du rapport DMACH/LA et des indices d'HCl et de dialyse permet d'accéder à une définition plus précise du degré de polymérisation des tanins condensés des vins.

Les différences observées entre DMACH/LA et l'indice HCl peuvent être expliquées par des modes de condensation (homogène ou hétérogène) et des encombrements stériques variables (tableau VI) :

- Les vins 3 et 4 du tableau VI ont des tanins très polymérisés (indice HCl voisin de 40) et un rapport DMACH/LA moyen (de l'ordre de 50) indiquant que les tanins sont peu encombrants (indice de dialyse faible, voisin de 15) ;

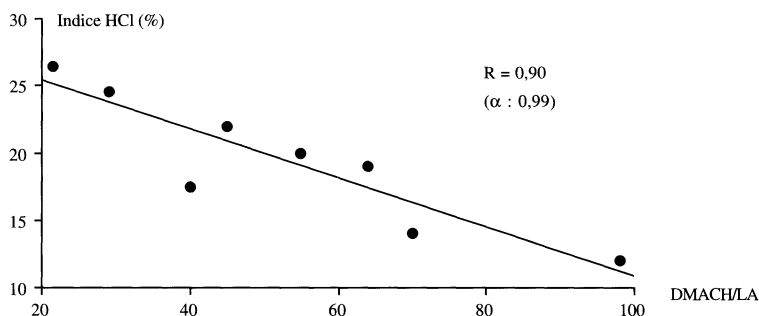
- Les échantillons 7 et 8 du tableau VI possèdent des tanins peu polymérisés (indices HCl de 5 pour le vin 7 et 12 pour le vin 8) avec d'une part un DMACH/LA élevé pour le vin 7 (DMACH/LA= 64) pour lequel les tanins sont peu encombrants (indice de dialyse= 6) et d'autre part un DMACH/LA moyen pour le vin 8 (DMACH/LA= 55) pour des tanins plus encombrants (indice de dialyse = 25).

**TABLEAU VI**

**Dosage des tanins (LA), des composés phénoliques totaux (d280) et estimation des indices DMACH/LA, HCl et dialyse de différents vins rouges**

Millésimes	Echantillons	Appellations	d280	LA (g/l)	DMACH/LA	Indice HCl	Indice dialyse
1990	1	Médoc	60	3,7	29	24	35
	2	Médoc	50	3,3	21	26	29
1992	3	Médoc	51	3,4	52	44	17
	4	St Emilion	39	1,9	64	19	11
	5	Madiran	76	3,9	59	34	20
	6	Anjou	34	1,7	51	45	15
1993	7	St Emilion	38	1,7	64	5	6
	8	St Emilion	50	2,3	55	12	25

Il semble donc que le rapport DMACH/LA est en relation avec l'encombrement des tanins, donc avec le type de polymérisation. On suppose alors, que pour une série de vins ayant le même mode de condensation des tanins, les valeurs du rapport DMACH/LA sont corrélées avec l'indice HCl. Pour vérifier cela, nous conservons pendant trois ans une série de vins à température constante pour favoriser les condensations homogènes. Les mesures des indices d'HCl et de DMACH/LA sont portées sur la figure 5. On observe que les différences liées à la structure des tanins se sont atténuées et la représentation DMACH/LA = f (HCl) devient linéaire. Dans ces vins, les combinaisons tanins anthocyanes sont maximales et voisines (indice de pvpp= 85 p. cent), l'encombrement stérique des tanins mesuré par l'indice de dialyse et leurs poids moléculaires estimés par l'indice HCl évoluent dans le même sens ( $r=0.75$  ;  $\alpha=0.03$ ).



**Fig. 5 — Comparaison des indices HCL et du rapport DMACH/LA pour différents vins conservés 3 ans en bouteille à 10 °C**

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La DMACH est un aldéhyde spécifique des structures présentant un noyau phloroglucinol, qui possède 3 groupements hydroxy en position *meta*. Les composés phénoliques des extraits de pellicules et de pépins et des vins, comme les acides-phénols et les anthocyanes, interfèrent peu dans la réaction. Cette propriété liée à la sélectivité de l'aldéhyde choisi, à l'égard des noyaux phloroglucinols, permet de révéler dans un mélange complexe des molécules comme les procyanidines. Le protocole retenu pour la préparation du réactif et la mesure du rapport DMACH/LA est rapide et relativement simple à mettre en œuvre.

Le rapport DMACH/LA donne des résultats comparables à l'indice de dialyse mis au point par GLORIES (1978). Ces deux indices permettent d'interpréter plus en détail le niveau de polymérisation des procyanidines, leur mode de condensation et leur encombrement stérique. La méthode proposée permet une mesure rapide directement sur les vins ou sur les extraits de pellicules et de pépins et de plus elle ne nécessite pas de dérivation préalable des tanins. Elle s'avère donc parfaitement adaptée au suivi de l'évolution du niveau de polymérisation des tanins au cours de la maturation du raisin, de la vinification, du travail, du traitement, de l'élevage et de la conservation des vins. L'étude de l'influence de différents facteurs (collage, phénomènes oxydatifs, synthèse de molécules, combinaisons, accessibilité des sites nucléophiles) est en cours dans notre laboratoire.

L'étude de la variation du rapport DMACH/LA pour différentes fractions phénoliques isolées de vins rouges, montre que l'intensité de la réaction est d'autant plus faible que le degré de polymérisation des tanins est élevé. Dans un milieu modèle contenant de la (+)-catéchine et supplémenté en éthanal, on observe la formation de tanins constitués d'empilement de catéchine-éthanal-catéchine décrit, dans les mêmes conditions, par DOURNEL (1985). Pour ce type de tanins, le rapport DMACH/LA diminue très rapidement. Ceci illustre le mode d'action de l'aldéhyde qui se fixe sur les sites nucléophiles libres des sommets négativés sur les carbones 6 et 8 du noyau benzénique A de la catéchine. Ce mécanisme très généralement admis a été confirmé par des études structurales sur plusieurs modèles phénoliques, dont la catéchine, avec des aldéhydes tel que la vanilline et la syringaldéhyde (ESTRELLA *et al.*, 1978). Dans les conditions de ce schéma réactionnel, plus le degré de condensation augmente et plus l'encombrement stérique des tanins rend difficile la fixation du DMACH sur ces sommets négativés, par diminution de leur accessibilité.

Cette notion est confirmée par la comparaison des valeurs du rapport DMACH/LA de fractions phénoliques de tanins condensés ( $2000 < Mr < 3000$ ) et de tanins très condensés ( $3000 < Mr < 5000$ ) qui est en moyenne respectivement de 45 et 15 ; les tanins très condensés ont un indice de dialyse plus élevé que les tanins condensés (17 pour TC et 32 pour Ttc), rendant moins accessibles les zones de fixation du DMACH. Des analyses complémentaires montrent que dans l'intervalle de masse moléculaire moyen des tanins du vin, le rapport DMACH/LA est linéaire par rapport à Mr et exprime une variation du degré de polymérisation des tanins. La méthode proposée présente en outre une bonne reproductibilité.

L'étude de l'influence de facteurs susceptibles de faire varier DMACH/LA a permis de confirmer le mode d'action de cet aldéhyde et de proposer un certain nombre d'applications, toutes en relation avec le suivi de la réaction provoquant une modification du degré de polymérisation moyen des tanins du milieu. L'application du rapport DMACH/LA à des extraits de pellicules et de pépins ainsi qu'à différents vins rouges montre les possibilités d'utiliser la méthode pour estimer le niveau de polymérisation des tanins extractibles du raisin et des vins rouges. Pour un même degré de polymérisation moyen des tanins du vin, le rapport DMACH/LA est plus faible dans les vins ayant subi des condensations oxydatives lors de l'élevage, car l'encombrement stérique des tanins, issus de condensation désordonnée, par l'intermédiaire de pont éthanal, est plus élevé que celui des tanins issus de condensation ordonnée, permis par la formation de carbocation en milieu réducteur et acide, il est plus fort dans les vins riches en catéchines ou en procyanidines dimères, comme les vins de presse ou les vins riches en tanins de pépins.

Des méthodes utilisant des principes différents permettent de mesurer avec une meilleure précision soit le degré de polymérisation (D.P.) correspondant au nombre d'unité flavane constituant le tanin condensé, soit la masse moléculaire ( $M_r$ ) correspondant au poids d'une molécule de tanin (PRIEUR et *al.*, 1994). Cependant l'ensemble de ces méthodes nécessite des pré fractionnement, des étapes de purification, de dérivation et d'analyse CLHP, qui se prête difficilement à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons et au suivi instantané de l'influence de facteur agissant sur le niveau de polymérisation des tanins condensés. La méthode à récemment été appliquée à la détermination de la cinétique de formation des polymères catéchine-éthanal-catéchine en milieu hydroalcoolique de composition proche du vin (SAUCIER, 1993).

Manuscrit reçu le 5 septembre 1994 ; acception pour publication le 7 octobre 1994

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BATE-SMITH E.C., 1956. Leuco-anthocyanins. 1- Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.*, **58**, 122-125.
- CHAPON S. et CHAPON L., 1977. Phénomènes d'oxydation catalytique dans les bières. *Proceedings of the 16th congress of the "European brewery convention"*, Amsterdam.
- DOURNEL J.M., 1985. Recherches sur les combinaisons anthocyanes-flavanols. *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle*, Université de Bordeaux II.
- ESTRELLA I., SANTA-MARIA G., HERNANDEZ T. et DIEZ C., 1978, Les réactions flavanol et flavanediol avec des groupes carbonyle. *Bull. liaison Groupe Polyphénols*, n°8. INRA (Ed.), Nancy.
- GALVIN C., 1993. Etudes de certaines réactions de dégradation des anthocyanes et de leur condensation avec les flavanols ; conséquences sur la couleur des vins rouges. *Thèse Doctorat*, Université de Bordeaux II.

- GLORIES Y., 1971. Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. *Thèse de 3<sup>e</sup> cycle*, Université de Bordeaux.
- GLORIES Y., 1974. Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. I - Précipitation par l'aldéhyde formique et par l'acide chlorhydrique concentré. *Conn. Vigne Vin*, **8**, n°1, 57-74.
- GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse doctorat d'état*, Université de Bordeaux.
- GLORIES Y., 1980. Evolution des composés phénoliques au cours du vieillissement du vin. *Ann. Nutr. Aliment.*, **32**, 1163-1169.
- GLORIES Y., 1984a. La couleur des vins rouges. I - les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Conn. Vigne Vin*, **18**, n°3, 195-217.
- GLORIES Y., 1987. Les phénomènes oxydatifs liés à l'élevage des vins rouges en barrique. *Conn. Vigne Vin*, n° hors série "Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie".
- GLORIES Y., 1990. Oxygène et élevage en barrique. *Rev. Fr. Œnol.*, **30**, n°124, 91-96.
- GLORIES Y. et RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Contribution à l'étude de la détermination de l'état de condensation des tanins des vins rouges. *Conn. Vigne Vin*, **7**, n°1, 15-38.
- GLORIES Y. et AUGUSTIN M., 1992. Structure des composés phénoliques et saveurs des vins rouges. In "C.R. INRA/VITI", INRA (Ed.), Bordeaux.
- HASLAM E., 1980. *In vino veritas* : Oligomeric procyanidins and ageing of reds wines. *Phytochem.*, **19**, 1577.
- HASLAM E. and LILLEY T.H., 1988. Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **27**, 1-38.
- LEA A.G. H., BRIDLE P., TIMBERLAKE C.F. and SINGLETON V.L., 1979. The procyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 289.
- MOUTOUNNET M., RABIER P., SARNI F. et SCALBERT A., 1993. Les tanins du bois de chêne. In "Élevage des vins en fûts de chêne" Y GLORIES (Ed.), C.E.P.S., Melun.
- MURROUGH I. and DOWELL J., 1978. Chromatographic separation and automated analysis of flavonols. *Anal. Biochem.*, **91**, 92-100.
- NAGEL C.W. and GLORIES Y., 1991. Use of a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, n°4, 364-366.
- PRIEUR C., RIGAUD J., CHEYNIER V. et MOUTOUNNET M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grapeseeds. *Phytochem.*, **36**, n°3, 781-784.
- RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1964. La constitution des tanins du raisin et du vin. *CR Acad. Agric. Fr.*, 662-671.
- RIBÉREAU-GAYON P. et GLORIES Y., 1971. Détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. *CR Acad. Sc. Paris.*, **273**, 2369.

- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBÉREAU-GAYON P. et SUDRAUD P., 1976. *Traité d'Œnologie, Sciences et Techniques du vin. Tome I, II et III.* Dunod (Ed.), Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., PONTALLIER P. and GLORIES Y., 1983. Some interpretation of colour changes in young red wines during their conservation. *J. Sci. Food Agricult.*, **34**, 505-516.
- RIGAUD J., PEREZ-ILZARBE J., RICARDO da SILVA J.M. and CHEYNIER V., 1991, Tioacydolyse of procyanidins of grape seeds and separation by HPLC. *J. Chromatogr.*, **540**, 401.
- RIGAUD J., ESCRIBANO-BAILLON M.T., PRIEUR C., SOUQUET J.M. and CHEYNIER V., 1993. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatogr.*, **654**, 255.
- ROBICHEAU J.L. and NOBLE A.C., 1990. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **53**, 343-353.
- SARKAR S.K. and HOWARTH R.E., 1976. Specificity of the vanillin test for flavonols. *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 317-320.
- SAUCIER C., 1993. Approche colloïdale de l'interaction tanins-polysaccharides dans les vins. *DEA Sciences biologiques et médicales option œnologie*, Université de Bordeaux II.
- SELF R., EAGLES J., GALLETI G.C., MUELLER-HARVEY I., HARTLEY R.D., LEA A.G.H., MAGNOLATO D., RICHLI U., GUJER R. and HASLAM E., 1986. Fast atom bombardement mass spectrometry of polyphenols (syn. Vegetable tannins). *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, **13**, 449-468.
- SINGLETON V.L., 1974. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. *Adv. Chem. Ser.*, **137**, 184-211.
- THIES M. and FISHER R., 1971. Über eine neue farbreaktion zum mikrochemischen nachweis und zur quantitativen bestimmung von catechinen. *Mikrochim. Acta*, **1**, 9-13.
- VIVAS N., GLORIES Y., DONECHE B. et GUEHO E., 1991. Observations sur la microflore du bois de chêne (*Quercus sp.*) au cours de son séchage naturel. *Ann. Sci. Nat. (Botanique)*, **11**, 4, 149-154.
- VIVAS N., CHAUVET S., GLORIES Y. et SUDRAUD P., 1993a. Caractérisation et définition des préparations commerciales de tanins œnologiques. *Ind. Alim. Agric.*, **110**, n°10, 705-713.
- VIVAS N., CHAUVET S., SUDRAUD P. et GLORIES Y., 1993b. Techniques de contrôle et d'évaluation de la qualité des tanins œnologiques. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **86**, 919, 215-222.
- VIVAS N., BOURGEOIS G., GLORIES Y. et VITRY C., 1994, Sur l'identification par spectrométrie de masse des produits formés par autoxydation de l'acide linoléique en milieu hydroalcoolique. *Sci. Aliments*, **14**, n°6, 846-852.