

DOSAGE DES COMPOSÉS SOUFRÉS VOLATILS LÉGERS DANS LES VINS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE ET PHOTOMÉTRIE DE FLAMME

Valérie LAVIGNE*, J.N. BOIDRON et D. DUBOURDIEU

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

Résumé : *Les composés soufrés volatils légers (point d'ébullition < 90°C) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse et détection à photométrie de flamme (FPD 393 nm).*

En raison de la forte volatilité des substances à doser, nous avons choisi d'utiliser la technique de "l'espace de tête", méthode simple à mettre en œuvre et qui permet d'apprécier, avec une bonne répétabilité, des quantités inférieures au microgramme par litre.

De plus, la détermination des seuils de perception des molécules dosées nous a permis d'évaluer leur incidence sur les défauts olfactifs de réduction rencontrés dans les vins.

INTRODUCTION

Les odeurs de réduction nauséabondes, évoquant le sulfure d'hydrogène et les mercaptans, constituent l'un des défauts les plus couramment rencontrés dans les vins. On les attribue depuis longtemps à la formation de composés soufrés volatils (thiols et sulfures) aux différents stades d'élaboration des vins: vinification, élevage, conservation en bouteilles. Cependant, l'identification et le dosage précis dans les vins des molécules responsables de ces arômes désagréables posent, aujourd'hui encore, des problèmes.

Ainsi, la plupart des dosages effectués sur les vins ou sur la bière sont seulement qualitatifs (MAUJEAN, 1990; PEPPARD, 1988; RAPP *et al.*, 1985). Les techniques mises en œuvre utilisent la chromatographie en phase gazeuse selon la technique d'espace de tête statique (MAUJEAN, 1978; PRZYJAZNY *et al.*, 1983) ou par un système de purge et piégeage (LE FUR *et al.*, 1991; PEPPARD, 1985).

La littérature ne rapporte que peu de résultats sur l'impact organoleptique des composés soufrés volatils dans les vins. Enfin, les mécanismes de formation de ces substances dans les moûts et les vins sont loin d'être complètement élucidés (GONIAK et NOBLE, 1987).

*chercheur pour la société SEGUIN MOREAU, détaché à l'Institut d'Œnologie

Nous nous proposons dans ce travail de doser les composés soufrés légers par la technique de l'espace de tête statique. Après détermination des seuils de perception olfactifs des composés analysés, la méthode de dosage proposée est appliquée à l'étude de l'incidence organoleptique des composés soufrés dans les vins.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — SÉPARATION ET DOSAGE DES COMPOSÉS SOUFRÉS LÉGERS

Les composés soufrés légers sont séparés par chromatographie en phase gazeuse sur un chromatographe HP 5890-I, équipé d'une colonne (4 m, 1/8 inch) remplie d'un support CHROMOSORB WHP 80-100 mesch imprégné à 12% de la phase stationnaire DC 200.

Le gaz vecteur utilisé est l'azote (250 KPa, 15,5 ml/mn). La température est programmée de 65°C (isotherme initiale 5 mn) à 110°C (isotherme finale 5 mn), à raison de 6°C/mn. L'injection est pratiquée à 115°C.

Le détecteur à photométrie de flamme est du type simple flamme, HP 19256-A, calé à 393 nm. Il est maintenu à 200°C et alimenté par: $H_2 = 93$ ml/mn, $O_2 + H_2$ (80 : 20) = 100 ml/mn, $N_2 = 55$ ml/mn.

II — IDENTIFICATION DES COMPOSÉS SOUFRÉS LÉGERS

L'identification des composés soufrés légers a été réalisée grâce à l'analyse de solutions de référence de chaque substance en milieu synthétique de composition suivante par litre: éthanol 10 p. cent, acide tartrique 5 g, solution ajustée à pH = 3,5 par addition de soude. Le repérage des pics de composés soufrés est effectué par comparaison des temps de rétentions relatifs des différents composés.

III — DOSAGE DES COMPOSÉS SOUFRÉS VOLATILS LÉGERS DANS LES VINS UTILISANT LA TECHNIQUE DE L'ESPACE DE TÊTE

Etant donné leur faible point d'ébullition, les molécules étudiées ne peuvent être extraites sans perte par des solvants organiques, c'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser la technique dite de "l'espace de tête". Cette technique est basée sur la répartition entre la phase liquide et la phase gazeuse des molécules présentes dans une solution. L'équilibre qui s'établit entre ces deux phases dans un échantillon en vidange et hermétiquement fermé est instable. Il dépend de différents paramètres et en particulier de l'importance du creux dans l'échantillon, du temps et de la température.

Pour obtenir des résultats reproductibles, il convient donc d'étudier l'influence de ces trois paramètres sur la répartition des sulfures et des thiols dans l'espace de tête et de définir des conditions standards d'analyse. Dans les différents échantillons préparés en solution synthétique, on fait varier le creux de 25 à 125 ml, la température de 18 à 37°C et le temps d'équilibration de 18 à 72 heures.

Le vin à doser est placé dans une demi-bouteille de 375 ml et additionné de 75 µl d'étalon interne (thiophène à 100 µg/l). Après avoir soustrait 75 ml de l'échantillon, celui-ci est fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon à jupe rabattable. Après 24 heures à température ambiante et à l'obscurité, afin d'éviter l'apparition d'éventuels "goûts de lumière", on prélève un volume connu de gaz à l'aide d'une seringue à insuline. On injecte 1 ml.

IV — LINÉARITÉ DU DOSAGE

La réponse d'un détecteur à photométrie de flamme n'évolue pas linéairement avec la concentration en soufre injectée: elle est approximativement proportionnelle au carré de la concentration en atomes de soufre. Cependant, dans le cas d'une injection d'un volume gazeux (espace de tête), deux lois déterminent la réponse (R) du détecteur en fonction de la concentration (C) de la substance à doser dans la solution de référence: le coefficient de partage de la substance et la réponse spécifique du détecteur aux composés soufrés.

Nous avons déterminé empiriquement, pour chacun des composés à étudier, la courbe de réponse du détecteur en fonction de la concentration de la substance en solution.

Pour les substances les moins volatiles, sulfure de diméthyle, disulfure de carbone, sulfure de diéthyle et disulfure de diméthyle, qui se présentent à l'état liquide à température ambiante, on injecte successivement des volumes gazeux ("espace de tête") de solutions de concentrations connues en sulfures volatils. En raison du point d'ébullition assez faible de ces substances, (38 à 110°C), les dilutions sont effectuées à 0°C.

Pour les thiols plus volatils, tels que le méthanethiol, l'éthanethiol ou le sulfure d'hydrogène, il est impossible de procéder à des dilutions sans perte. Leurs points d'ébullition sont, en effet, beaucoup plus bas (de -60°C à 35°C). En outre, le méthanethiol et le sulfure d'hydrogène sont gazeux à température ambiante et il est difficile d'en préparer des solutions de titre connu par pesée. Pour s'affranchir de cette difficulté, nous utilisons la forte affinité des sels mercuriques vis-à-vis des thiols.

L'acide parahydroxy-mercurybenzoïque (PHMB), par exemple, forme avec les thiols un complexe non volatil.

La réaction des deux constituants s'effectue mole à mole (JOCELYN, 1974; ASHWORTH, 1976). De plus, la combinaison thiols-PHMB est réversible en présence d'un excès d'un autre thiol dont l'affinité pour le PHMB est supérieure. Pour décomposer le thiol à doser, nous utilisons le glutathion pur à une concentration 100 fois supérieure à celle du PHMB.

Pour constituer des solutions de référence, on procède de la façon suivante. On ajoute à une solution de PHMB 1 mM (9 mg PHMB, 1 ml NaOH 0,01 N, qsp eau distillée à 25 ml), l'un des thiols à doser en excès. Après une heure, l'excès de thiol est éliminé par agitation magnétique sous reflux d'azote. On obtient ainsi une solution à 1 mM du thiol à doser. Dans ces conditions, les dilutions peuvent être effectuées sans perte. Les solutions complexées de titre connu ainsi obtenues sont additionnées de glutathion. L'analyse des échantillons est effectuée dans les conditions décrites précédemment.

V— DÉTERMINATION DES SEUILS OLFACTIFS DE PERCEPTION DES COMPOSÉS SOUFRÉS LÉGERS

Les seuils de perceptions des composés soufrés, se présentant à l'état liquide à température ambiante et dont le point d'ébullition est supérieur à 37°C (sulfure de diméthyle, sulfure de diéthyle, disulfure de diméthyle), ont été déterminés par dégustations triangulaires selon la méthode décrite par BOIDRON *et al.*, (1988).

Afin de déterminer avec précision les seuils de perception des thiols les plus volatils (sulfure d'hydrogène, méthanethiol et éthanethiol), des solutions de concentrations croissantes de chaque substance ont été préparées. La libération des thiols par le glutathion est effectuée dans les verres à dégustation, sur lesquels on pose, immédiatement après, un couvercle. Après environ un quart d'heure, le jury, constitué de 20 dégustateurs, détermine la concentration à partir de laquelle il perçoit l'odeur.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

I — IDENTIFICATION DES COMPOSÉS SOUFRÉS LÉGERS VOLATILS DANS LES VINS

La figure 1 présente le chromatogramme des composés soufrés légers d'un vin blanc, obtenu dans les conditions d'analyse décrites précédemment. La plupart de ces composés est habituellement signalée dans les vins. Cependant, peu d'exemples d'identification du sulfure de carbonyle sont rapportés dans la littérature.

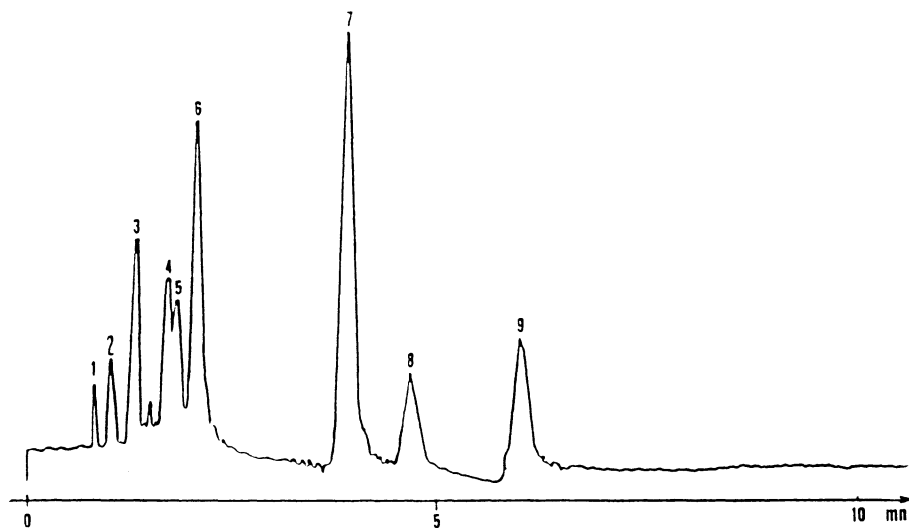


Fig. 1 — Chromatogramme des composés soufrés légers détectés en FPD dans un vin
1 : sulfure de carbonyle; 2 : sulfure d'hydrogène; 3 : méthanethiol; 4 : éthanethiol; 5 : sulfure de diméthyle;
6 : disulfure de carbone; 7 : thiophène (ei); 8 : sulfure de diéthyle; 9 : disulfure de diméthyle

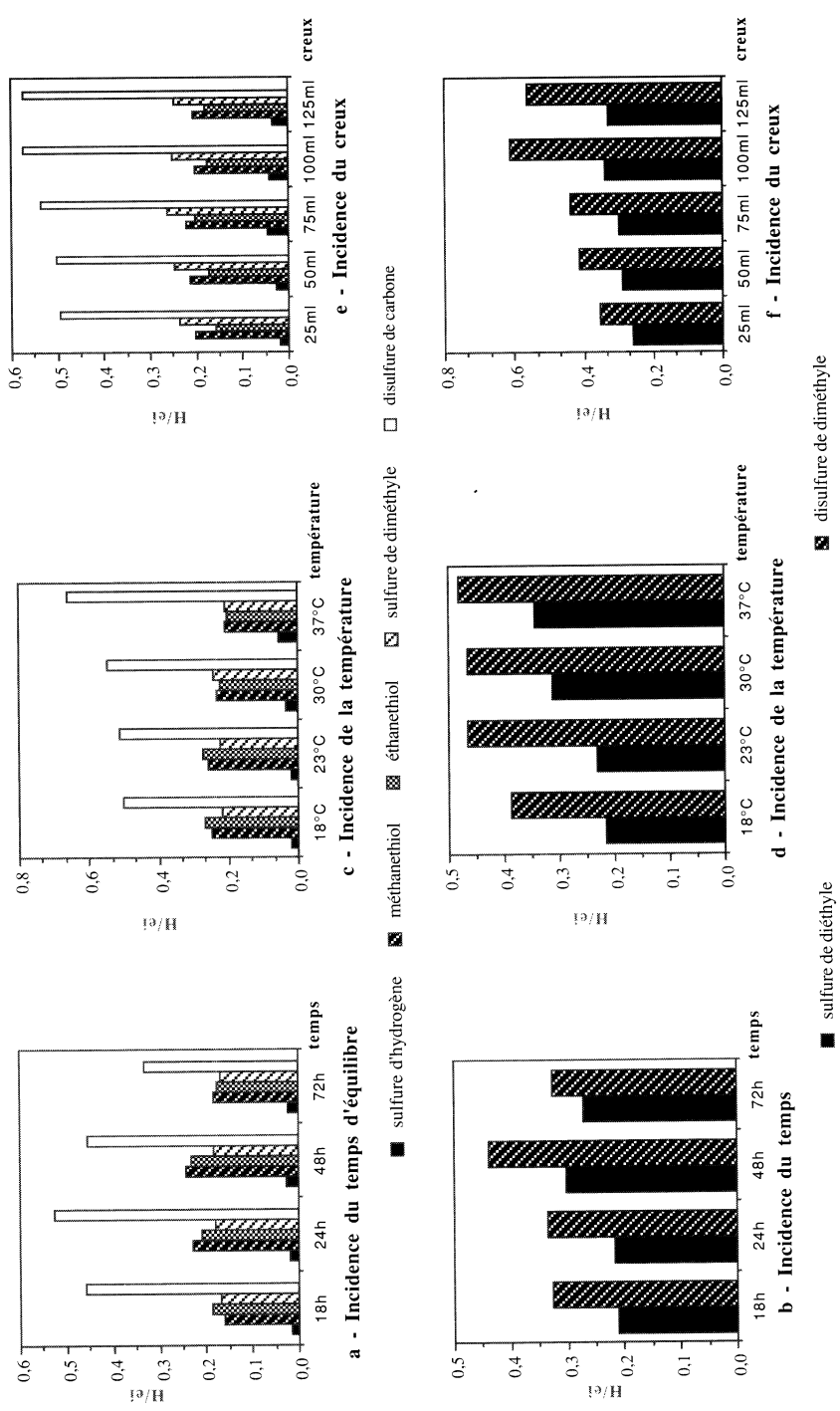
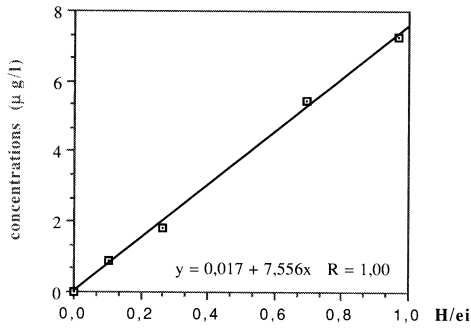
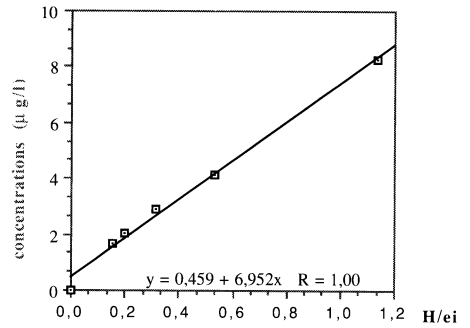


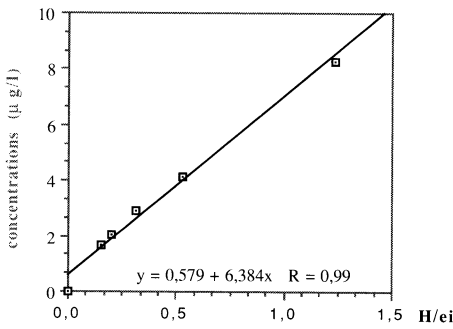
Fig. 2 — Incidence du temps d'équilibre, de la température et du "creux" sur la répartition des molécules entre la phase liquide et la phase gazeuse



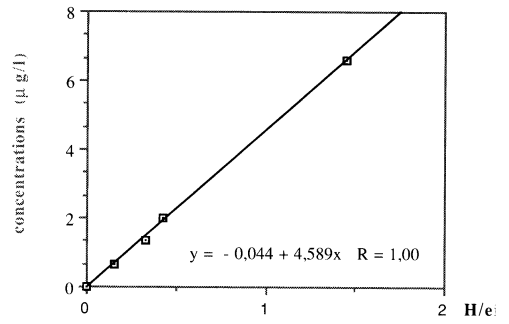
a - Etalonnage du sulfure d'hydrogène



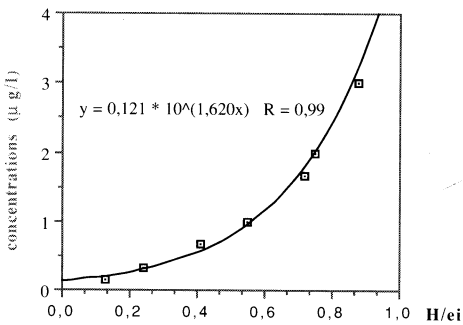
b - Etalonnage du méthanthiol



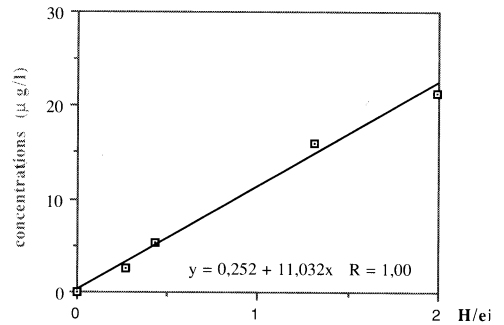
c - Etalonnage de l'éthanthiol



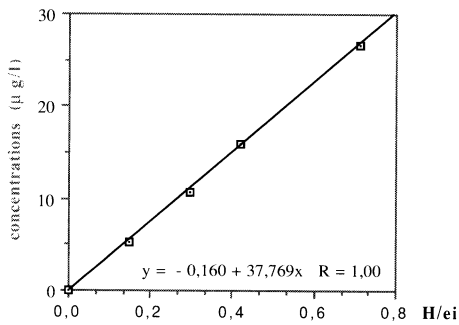
d - Etalonnage du sulfure de diméthyle



e - Etalonnage du disulfure de carbone



f - Etalonnage du sulfure de diéthyle



g- Etalonnage du disulfure de diméthyle

Fig. 3 — Etalonnage de la réponse du détecteur FPD pour les composés sulfurés légers

II — OPTIMISATION DES CONDITIONS DE L'ESPACE DE TÊTE

Après 48 heures d'équilibre à température ambiante (23°C) pour un creux de 75 ml, on observe une diminution des concentrations en thiols et en sulfures dans l'espace de tête. Pour le sulfure d'hydrogène, le méthanethiol, l'éthanethiol, le sulfure de diéthyle et le disulfure de carbone, l'équilibre est obtenu après 24 heures. En revanche, les concentrations maximales en sulfure de diéthyle et disulfure de diméthyle dans la phase gazeuse ne sont atteintes qu'après 48 heures. Pour l'ensemble des paramètres étudiés, ces deux substances ont un comportement différent des autres molécules. Moins volatiles, leur passage dans la phase gazeuse s'effectue plus lentement. Il est favorisé par des températures élevées (30°C) et un creux important (100 ml). Ces deux substances pouvant être dosées par une méthode de dosage des composés soufrés lourds (CHATONNET *et al.*, 1992), nous avons choisi les conditions opératoires optimisant le dosage des substances les plus volatiles soit, 75 ml de "creux", température ambiante (23°C), 24 heures d'équilibre (figure 2).

III — ÉVALUATION DE LA MÉTHODE ANALYTIQUE PROPOSÉE

1) Sensibilité

Dans les conditions opératoires décrites, la limite de détection et de dosage se situe autour de 0,1 µg/l pour le disulfure de carbone et de 0,4 µg/l pour les autres substances étudiées.

2) Linéarité

On constate (figure 3), qu'excepté pour le disulfure de carbone, la réponse du détecteur varie linéairement avec la concentration de la substance à doser dans l'échantillon.

3) Répétabilité de l'analyse

Le tableau I regroupe les analyses de 10 échantillons identiques. Le coefficient de variation moyen est de 4,2 p. cent.

TABLEAU I

Répétabilité de la méthode de dosage des composés soufrés légers

Substances (H/ei)	CV% Coefficient de variation	Z% Coefficient de reproductibilité (seuil de risque 5%)
Sulfure d'hydrogène	5,7	11,6
Méthanethiol	4,7	10,6
Sulfure de diméthyle	2,8	6,5
Éthanethiol	4,5	9,1
Disulfure de carbone	3,6	8,4
Sulfure de diéthyle	4,2	9,8
Disulfure de diméthyle	3,8	9,4

4) Ajouts dosés :

Un rajout connu des différents sulfures et thiols dosés est retrouvé avec une précision satisfaisante (tableau II).

En conclusion, la méthode proposée, simple à réaliser, permet des dosages quantitatifs des composés soufrés légers avec une bonne reproductibilité. Il conviendrait cependant, de quantifier le sulfure de carbonyle.

TABLEAU II
Recherche de quantités connues de composés soufrés légers

Substances	Quantités ($\mu\text{g/l}$)		
	initiale	ajoutée	retrouvée
Sulfure d'hydrogène	0,3	0,4	0,65
Méthanethiol	0,7	0,3	0,9
Éthanethiol	1	0,9	2,1
Sulfure de diméthyle	1,9	0,7	2,5
Disulfure de carbone	1,6	0,5	2,1
Sulfure de diéthyle	8,4	2	9,8
Disulfure de diméthyle	16,4	2,7	20,5

IV — APPLICATION À L'ANALYSE DES VINS. EXEMPLE DE RÉSULTATS

Dans le tableau III, nous donnons les résultats d'analyse de différents vins: deux vins rouges d'assemblage (a et b) (Cabernet Sauvignon et Merlot, 1990), l'un présentant un défaut de réduction et trois vins blancs (a, b et c) (Sauvignon, 1991). Les vins blancs b et c sont marqués, à la dégustation, par des notes aillacées et sulfureuses.

Hormis le sulfure de carbonyle que l'on évalue par le rapport (H/ei), toutes les autres substances identifiées ont pu être dosées.

Le méthanethiol, le sulfure de diméthyle, le disulfure de carbone et le disulfure de diméthyle sont les substances les plus représentées. Leur concentration est plus importante dans les vins réduits.

Le sulfure d'hydrogène est absent des trois vins blancs analysés. En revanche, les deux vins rouges en contiennent.

Excepté pour le sulfure de carbonyle, substance toxique très volatile, et le disulfure de carbone, les seuils de perception olfactive des différentes substances présentes dans les vins ont pu être déterminés (tableau IV). Ils vont nous permettre d'apprécier le rôle organoleptique de ces molécules dans les vins.

TABLEAU III**Teneurs en composés soufrés de différents vins**

Substances	Vin rouge		Vin blanc		
	net	réduit	a net	b peu réduit	c réduit
Sulfure de carbonyle**	0,3	0,7	0,7	0,8	1,4
Sulfure d'hydrogène*	0,6	2	0	0	0
Méthanethiol*	0,7	1,6	1,7	2,3	4,2
Éthanethiol*	0	0,4	0	0	0,4
Sulfure de diméthyle*	3,5	8,5	1,4	1,5	1,9
Disulfure de carbone*	2,3	3,6	1,7	1,7	2,8
Sulfure de diéthyle*	0	0	0	0	0
Sulfure de diméthyle*	0	2,7	0	3,5	4,3

*dosées en µg/l

** évalué par le rapport: (surface du pic de substance/surface de l'étalon interne)

TABLEAU IV**Seuils de perception de quelques composés soufrés volatils légers**

Substances	Solution modèle S	Vin blanc SR	Descripteurs
Sulfure de carbonyle			éthéré
Sulfure d'hydrogène	0,8	—	œuf pourri
Méthanethiol	0,3	—	croupi
Éthanethiol	0,1	1,1*	oignon
Sulfure de diméthyle	5	160	coing, asperagine
Disulfure de carbone	—	—	caoutchouc
Sulfure de diéthyle	6	15	ail
Disulfure de diméthyle	2,5	45	choux

S: seuil de perception; SR: seuil de recouvrement

Les chiffres représentent des µg par litre

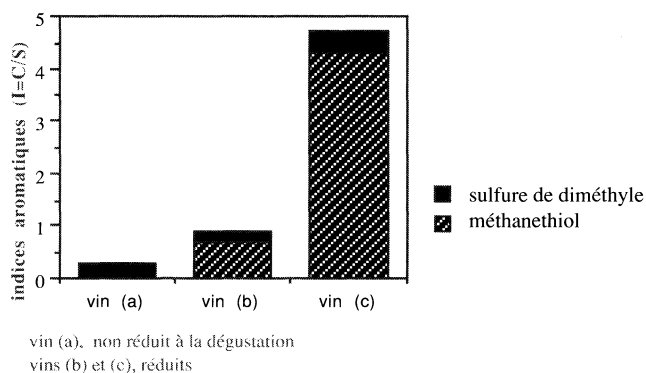


Fig. 4 — Incidence organoleptique de quelques composés soufrés légers dosables dans un vin blanc.
Calcul des indices aromatiques $I = C/S$
(C = concentration de la substance, S = seuil de perception en solution synthétique)

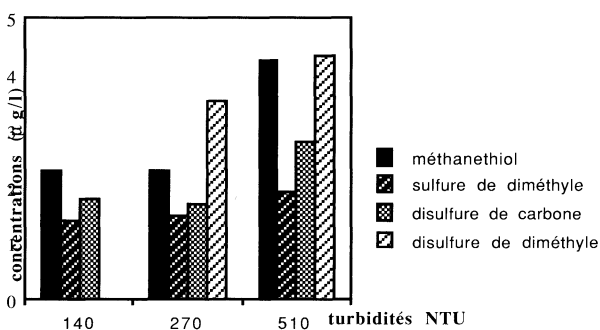


Fig. 5 — Incidence de la turbidité des moûts sur la teneur en composés soufrés légers des vins

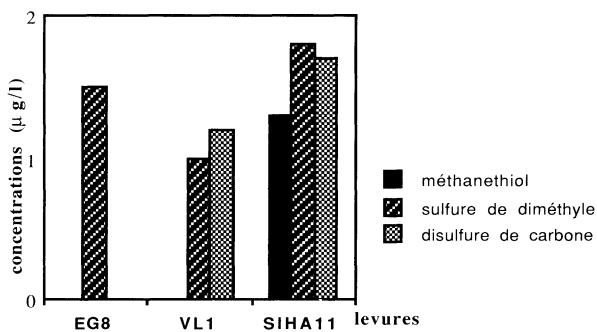


Fig. 6 — Incidence de la souche de levure sur la teneur des vins en composés soufrés légers

Dans le vin blanc (a), la somme des indices aromatiques des substances dosées, dont on connaît le seuil de perception, est inférieure à 0,5. Cette valeur atteint 1 pour le vin (b) faiblement réduit et 4,5 pour le vin (c) fortement réduit.

Les teneurs en sulfure de diméthyle des trois vins sont proches. Le défaut de réduction est donc essentiellement imputable à la présence de méthane-thiol dans les vins (b) et (c) (figure 4).

V — INCIDENCE DE CERTAINS PARAMÈTRES DE LA VINIFICATION DES VINS BLANCS SECS SUR LA FORMATION DES COMPOSÉS SOUFRÉS VOLATILS LÉGERS

Les paramètres étudiés sont la turbidité des moûts et la souche de levure utilisée comme levain.

Des dosages quantitatifs ont également été effectués 3 mois après l'achèvement de la fermentation alcoolique sur des vins sulfités (cépage Sauvignon), issus du même moût fermenté en barriques et ajustés par des débourbages de durées variables aux turbidités de 140, 270 et 510 NTU (figure 5).

A ce stade, l' H_2S a disparu, mais les autres composés soufrés sont présents en quantité variable selon la turbidité du moût. Le disulfure de diméthyle, absent à 140 NTU, apparaît à 270 NTU en quantité supérieure au seuil de perception (2,5 $\mu g/l$).

De même, la souche de levure influence la formation des composés soufrés légers. Par exemple, dans un essai réalisé au laboratoire sur un moût de Sauvignon, seule la souche SIHA 11 produit du méthane-thiol dosable à la fin de la fermentation alcoolique et en quantité dépassant le seuil de perception (figure 6).

CONCLUSION

Ce travail constitue une première approche analytique et technologique des problèmes olfactifs de réduction imputables à certains composés soufrés produits par la levure au cours de la vinification.

La méthode de dosage proposée, simple à mettre en œuvre, a permis de préciser les teneurs des vins en composés soufrés légers et de déterminer l'incidence organoleptique de certains d'entre eux.

Cette méthode analytique a été appliquée à l'étude de quelques facteurs technologiques pouvant favoriser l'apparition des défauts olfactifs de réduction dans les vins blancs. Il apparaît clairement que, pour une vendange donnée, les conditions de débourbage jouent un rôle prépondérant. Dans la majorité des cas, la plage de turbidité (50 à 200 NTU) proposée pour les moûts des cépages bordelais après débourbage permet d'éviter une formation anormalement élevée de composés soufrés pendant la vinification.

Manuscrit reçu le 17 novembre 1992; accepté pour publication le 20 janvier 1993

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASHWORTH M.R.F., 1976. *The détermination of sulphur-containing groups, 2*. Academic Press London, New-York, San Francisco
- BOIDRON J.N, CHATONNET P. et PONS M., 1988. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Connaissance Vigne Vin*, **22**, n°4, 275-294
- CHATONNET P., LAVIGNE Valérie, DUBOURDIEU D. et BOIDRON J.N., 1992. Identification et dosage de certains composés soufrés volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Alim.*, n°3, 513-532
- GONIAK O.J. et NOBLE A.C., 1987. Sensory study of selected volatile sulfur compounds in white wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, n° 3, 223-227
- JOCELYN P.C., 1974. *Biochemistry of the SH group*. Academic Press, London
- LE FUR Y., FEUILLAT M., ETIEVANT P.X., 1991. Analyse des composés soufrés de faible poids moléculaire dans les vins blancs issus de cépage Aligoté. *Rev. Fr Œnol.*, Cahier scientifique, n°128, 7-13
- MAUJEAN A., 1978, Contribution à l'étude des goûts de lumière dans les vins de champagne, *Connaissance Vigne Vin*, **12**, n°4, 277-280
- MAUJEAN A., 1990. Influence d'agents extérieurs physico-chimiques à l'origine de goûts sulfhydriques et de réduction dans les vins. Moyens de prévention. *In Résumé des conférences Œnotech 90*, 43-69, Palexpo
- PEPPARD T.L., 1985. Development of routine investigational tools for the study of sulphury flavours in beer. *J. Inst. Brew.*, **91**, 364-369
- PEPPARD T.L., 1988. *In Beer Analysis*. Linskens H.F. (ed.), 241-253, Springer-verlag, Berlin
- PRZYJAZNY A., JANICKI W., CHRZANOWSKI W. and STASZEWSKI R., 1983. Headspace gas chromatographic determination of distribution coefficients of selected organosulphur compounds and their dependance on some parameters. *J. Chromat.*, **280**, 249-260
- RAPP A., GUNTERT M. and ALMY J., 1985. Identification and signifiacnce of several sulfur containing compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic*, **36**, n°3, 219 - 221