

ÉTUDE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE DE SUBSTANCES VOLATILES ISSUES DU BOIS DE CHÊNE

F. MARSAL * et Ch. SARRE **

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

INTRODUCTION

Depuis quelques années, de nombreuses études ont été réalisées afin de préciser le rôle organoleptique du bois de chêne lors de l'élaboration et de la conservation des vins (NAUDIN, 1986 a et b ; DUBOIS, 1984 ; FEUILLAT, 1982). Nos recherches actuelles, portant sur une étude chimique du bois des fûts destinés à l'élevage des vins, comportent plusieurs objectifs : d'une part, connaître les substances libérables par le bois, d'autre part suivre leur apport en fonction de l'origine géographique et du degré de brûlage (lors du cintrage au feu des barriques) des bois merrains.

Nous nous sommes intéressés aux composés suivants : furfural (parfois improprement nommé furfurol), méthyl-5 furfural, alcool furfurylique ou furfurol et β -méthyl γ -octalactone. Cette lactone (butyl-5 méthyl-4 « oxolanone-2 » en nomenclature systématique hétérocyclique) est plus couramment désignée sous les noms de « whisky-lactone » ou « oak-lactone » ; dans ce travail, elle sera nommée « γ -lactone ».

L'origine de ces substances est diverse. Certaines sont naturelles comme les isomères *cis* et *trans* de la « γ -lactone ». D'autre comme le furfural et le méthyl-5 furfural peuvent provenir de la dégradation thermique des polysaccharides du bois (notamment des hémicelluloses). Ces substances ont déjà été signalées par différents auteurs travaillant, en particulier, sur les constituants des eaux-de-vie (PUECH et *al.*, 1984 ; NYKANEN et SUOMALAINEN, 1983 ; PIGOTT, 1983 ; MASUDA et NISHIMURA, 1971). L'alcool furfurylique a été signalé par divers auteurs (STERN et *al.*, 1975 ;

* Stagiaire de Recherche SEGUIN-MOREAU, Cognac (France).

** Chef de Travaux, Laboratoire Interrégional de la Répression des Fraudes, Bordeaux (France).

CHAUDHARY et *al.*, 1968) sans que ces derniers apportent des précisions sur son origine.

A notre connaissance, il n'existe pas de méthode de dosage précise, sensible et reproductible de ces substances. Aussi, dans un premier temps, nous avons mis au point une méthode, par chromatographie en phase gazeuse, d'identification et de dosage de ces substances et ensuite nous les avons mises en évidence dans des solutions synthétiques dans lesquelles des bois avaient macéré et dans différents vins.

MATERIELS ET METHODE

I. — MATERIELS.

On utilise deux colonnes capillaires de polarités différentes pour identifier par leurs temps de rétention les divers composés. Dans des conditions analytiques bien définies (type de phase stationnaire, température de la colonne, nature et débit du gaz vecteur), le temps de rétention est une caractéristique qualitative d'un composé volatil. Si sur chaque colonne nous retrouvons quantitativement un pic ayant le même temps de rétention que celui d'une substance donnée, nous pouvons en déduire qu'il doit s'agir d'un même produit. L'identification chromatographique se réduisant à la mesure d'un temps de rétention, seule la spectrométrie de masse peut préciser la nature chimique d'un pic.

La première colonne (50 m × 0,35 mm), en silice fondue, de type WCOT, est imprégnée d'une phase polaire CP Wax 52 CB (Chrompack) gréffée chimiquement. L'épaisseur du film de phase stationnaire est de 0,19 µm. Cette colonne est adaptée sur une chromatographe Carlo Erba de type Fractovap 2900, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du four est programmée de 45°C, avec isotherme pendant 1 mn, jusqu'à 240°C, à raison de 3°C par minute. Le débit du gaz vecteur, l'hydrogène, est de 1,2 ml par mn. Le détecteur est alimenté par un mélange d'azote-oxygène (80/20 V/V) à 300 ml par mn et d'hydrogène à 20 ml par mn.

Les injections sont effectuées en « split-less », le temps de fermeture des vannes est de 20 secondes, le rapport de division entre le débit dans la colonne et celui de la fuite de division est de 1 p. 100. L'enregistrement des chromatogrammes est assuré par un intégrateur Enica 21 de 128 K RAM.

La seconde colonne (50 m × 0,45 mm) est également en silice fondue, de type WCOT, à phase stationnaire apolaire CP Sil 5 CB (Chrompack) gréffée chimiquement. L'épaisseur du film de phase stationnaire est de 4,5 µm. Le chromatographe utilisé est un appareil Hewlett-Packard (modèle 5890) muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La température du four est programmée de 40°C, avec isotherme de 2 mn, jusqu'à 260°C, à raison de 3°C par mn. Le débit du gaz vecteur, l'hydrogène, est réglé à 0,9 ml par mn.

Les injections sont effectuées en « split-less », avec un temps de fermeture des vannes de 30 secondes. Le rapport de division entre le débit dans la colonne et celui de la fuite est de 1/80. Les données chromatographiques sont traitées par un intégrateur Hewlett-Packard (n° 3393) avec stockage sur disque dur d'une capacité de 20 Méga octets pour permettre un retraitement des informations.

II. — METHODES.

1) *Préparation des morceaux de bois.*

Des morceaux de bois ($11 \times 2 \times 1$ cm), provenant d'un même chêne de l'Allier, séchés à l'air libre pendant trois ans sont placés dans un milieu synthétique contenant par litre : éthanol, 12 p. 100 ; acide tartrique, 5 g ; dioxyde de soufre, 30 mg ; et ajusté à pH 3,5.

Dans deux bocaux de verre (capacité unitaire 1 litre) on place dans chacun 900 ml de la solution synthétique. Dans un des bocaux on introduit 4 morceaux de bois brut, dans le second 4 morceaux de bois préalablement brûlés, par passage 15 minutes dans un four à 300°C ; les morceaux de bois brûlés ne sont placés dans les bocaux qu'après retour à la température ambiante. Les bocaux sont fermés hermétiquement, placés à l'étuve à 20°C pendant six mois.

Pour les morceaux de bois immergés dans la solution synthétique le rapport surface/volume est de 311 cm² par litre. A titre de comparaison, dans une barrique bordelaise, le rapport est de 86 cm² par litre, soit 3,6 fois moins (la surface intérieure d'une barrique est de 1,93 m²).

2) *Techniques d'extraction.*

Dans une fiole jaugée bouchant à l'émeri on place 20 ml de la solution à doser et on ajoute un étalon interne sous la forme de 2 ml d'une solution d'octanol-3 à 25 mg par litre d'éthanol à 20 p. 100 ; on amène le pH à 8,5 pour éviter d'extraire les acides gras volatils qui perturberaient la séparation des substances intéressantes. Le dosage de la lactone est quantitatif même à pH 8,5 (Tableau I).

On effectue ensuite trois extractions successives sous agitation magnétique de 5 minutes ; par 15 ml, puis par 5 ml d'éther éthylique et enfin par 5 ml d'un mélange éther éthylique/hexane (1/1 en volume). Les phases organiques sont rassemblées et séchées sur sulfate de sodium anhydre. L'extrait obtenu est transféré dans un tube conique (capacité 15 ml) et concentré sous courant d'azote jusqu'à un volume de 2 ml. Les tubes sont ensuite placés, pendant quelques minutes, à une température de + 4°C pour condenser les substances volatiles déposées sur les parois ; on homogénéise et on injecte dans le chromatographe.

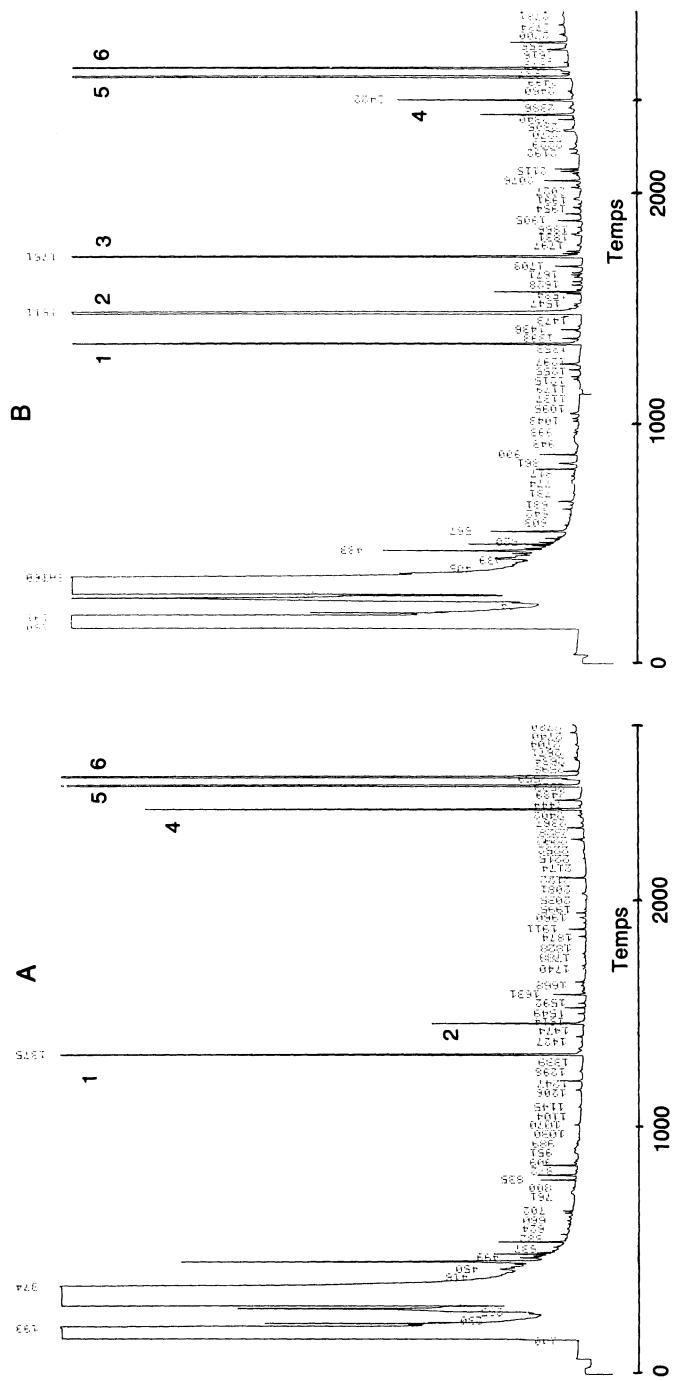


Fig. 1. — Chromatogrammes de l'extrait de bois non brûlé A et de bois brûlé B.
 1 : "octano-3" (étalon interne); 2 : furfural; 3 : méthyl-5 furfural; 4 : cis β -lactone; 5 : ionol (impureté de l'éther); 6 : trans β -lactone.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. — SEPARATIONS OBTENUES ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES.

Les chromatogrames des figures 1 A et 1 B ont été obtenus dans les conditions précédemment décrites par injection des extraits de la solution contenant les morceaux de bois non brûlés et brûlés.

La connaissance du temps de rétention d'un composé chimique, en chromatographie de partage en phase gazeuse est insuffisante pour affirmer sa nature. Aussi nous avons confirmé l'identification des substances isolées, par spectrométrie de masse.

Les caractéristiques des spectres de masse de l'alcool furfurylique, (isolé à partir d'un vin blanc sec fermenté en barriques neuves) et des isomères *cis* et *trans* de la « γ -lactone », (provenant d'une macération hydroalcoolique de bois de l'Allier séché et non brûlé), sont les suivantes :

Alcool furfurylique

m/z : 98, pic de base, ion moléculaire ; 97, perte d'un H du groupement hydroxyméthyle, 70 ; 69 ; 55 ; 53 ; 42 ; 41 ; 39.

Cis et trans « γ -lactone »

m/z : 156, pic moléculaire ; 99, pic de base, perte du groupement butyle ; 87 ; 71 ; 69.

(m représente la masse des ions formés et z leur charge).

La lactone obtenue par synthèse chimique est commercialisée sous la forme d'un mélange des isomères *cis* et *trans* dans des proportions de 1 pour 4, sans savoir lesquels prédominent. La présence de deux carbones asymétriques sur la molécule permet de prévoir de plus l'existence de quatre formes stéréoisomères possibles : les formes *cis* (+) et (—) et les formes *trans* (+) et (—). KEPNER et al. (1972) attribuent, en fonction de critères de la RMN du proton, la configuration *cis* aux isomères synthétisés en majorité par la voie chimique. Si l'on injecte le mélange commercial sur les deux colonnes capillaires utilisées, on constate que les isomères prédominants, supposés *cis*, donnent un seul pic chromatographique dont le temps de rétention est inférieur à celui des seconds isomères, supposés *trans*.

La détermination quantitative de la « γ -lactone » nécessiterait l'obtention des formes pures *cis* et *trans* afin de pouvoir préparer une référence de dosage.

La séparation quantitative de ces isomères par chromatographie en couche mince (OTSUKA et al., 1974) a été tentée sans succès. Nous avons dû considérer dès lors, afin de rendre possible un dosage, que les deux

formes *cis* et *trans* avaient la même réponse au niveau du détecteur à ionisation de flamme.

II — REPETABILITE.

La répétabilité du dosage a été étudiée à partir d'une solution synthétique (composition semblable à celle utilisée pour les macérations de bois) contenant : du furfural, 1 mg par litre ; du méthyl-5 furfural, 1 mg par litre ; du furfurol, 1 mg par litre et de la γ -lactone, 1,6 mg par litre ; dix extraits différents de cette solution sont injectés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I.

Nous avons calculé, pour chaque substance, la moyenne \bar{x} des rapports de la surface du composé à celle de l'étalon interne, l'écart-type σ (pour la pondération $n-1 = 9$) et le paramètre z pour le coefficient de Student t 0,05 est de 2,26 pour un test effectué sur 10 échantillons. Les valeurs Z obtenues pour les substances analysées varient entre 4,5 pour l'alcool furfurylique et 9,6 pour un groupe d'isomères de la « γ -lactone » (ceux qui sont élués en second sur nos chromatogrammes).

TABLEAU I

Répétabilité des dosages du furfural, du méthyl-5 furfural, de l'alcool furfurylique et des isomères *Cis* et *Trans* de la « γ -lactone ».

Les chiffres correspondent au rapport surface du pic / surface de l'étalon interne.

	\bar{x} pH 3,5	\bar{x} pH 8,5	σ pH 8,5	z pH 8,5
Furfural	0,209	0,203	0,0048	5,4
Méthyl-5 furfural	0,247	0,243	0,0056	5,3
Alcool furfurylique	0,165	0,168	0,0033	4,5
<i>Cis</i> « γ -lactone » (1)	0,432	0,440	0,0155	8,0
<i>Trans</i> « γ -lactone » (1)	0,098	0,095	0,0040	9,6

(1) La méthode utilisée et nos connaissances actuelles ne nous permettent pas d'affirmer la configuration *cis* ou *trans*. x : moyenne ; σ : écart-type ; z : coefficient de variation.

Les résultats obtenus sont très satisfaisants. Ils montrent également que le fait d'amener la solution avant extraction de pH 3,5 à pH 8,5 est sans influence sur les teneurs trouvées.

III. — PROPORTIONNALITE.

La proportionnalité entre la surface des pics et la concentration initiale en ces divers composés, notamment dans le but d'une application au

vin, a été étudiée à partir d'un vin rouge, dépourvu au départ des substances issues du bois (fermentation et conservation réalisées en cuve inox) et enrichi en différents composés. Les vins ainsi préparés sont traités selon le mode opératoire précédemment défini. Dans chaque cas, on calcule le rapport de la surface du pic d'un composé à la surface de l'étalon interne.

Les résultats rassemblés dans le tableau II montrent qu'il existe une bonne proportionnalité entre la surface et la concentration pour chacun de ces produits, et ce, pour une gamme très étalée, bien au-delà des teneurs rencontrées dans les vins mais qui peuvent se trouver dans les macérations de bois.

TABLEAU II

Proportionnalité entre la surface des pics et la concentration initiale en composés volatils issus du bois.

Les teneurs sont exprimées en mg par litre.

Furfural		Méthyl-5 furfural		Alcool furfurylique		cis « γ -lactone» (1)		trans « γ -lactone» (1)	
Teneurs	R	Teneurs	R	Teneurs	R	Teneurs	R	Teneurs	R
0,23	0,09	0,22	0,12	0,23	0,09	0,13	0,10		
0,46	0,16	0,44	0,23	0,46	0,16	0,26	0,24		
0,92	0,30	0,88	0,45	0,92	0,29	0,52	0,42	0,12	0,06
2,30	0,84	2,20	1,04	2,30	0,71	1,30	0,96	0,30	0,19
4,60	1,55	4,40	2,00	4,60	1,36	2,60	1,87	0,60	0,37
9,20	3,14	8,80	4,03	9,20	2,92	5,20	3,62	1,20	0,73
46,0	14,35	44,0	19,06	46,0	13,08	26,0	17,67	6,0	3,55

R : rapports de la surface du pic d'un composé à celle de l'étalon interne pour les diverses concentrations.

IV. — APPLICATION.

A titre d'exemple, nous donnons dans le tableau III les teneurs en furfural, méthyl-5 furfural et γ -lactone trouvées dans le liquide de macération, de morceaux de bois de chêne de l'Allier, non brûlé et brûlé. Le bois brut cède du furfural et de la γ -lactone ; une des formes de cette lactone est prédominante, elle représente 7 fois plus que la seconde. Le brûlage entraîne une augmentation très importante de la teneur en furfural, elle passe de 1 à 100 et il apparaît du méthyl-5 furfural. La teneur en γ -lactone diminue de moitié lorsque les morceaux de bois sont brûlés. Dans ces solutions synthétiques nous n'avons pas trouvé d'alcool furfurylique.

Dans le tableau III, nous donnons également les teneurs en ces mêmes substances pour deux échantillons d'un vin rouge (Saint-Emilion 1985) vinifié en cuve en acier inoxydable et dont une partie est élevée en cuve et l'autre en barrique et pour deux vins blancs (Bordeaux sec 1986) provenant d'un même moût dont une partie est vinifiée et élevée en barrique. Dans les vins rouges et les vins blancs qui, au cours de la vinification et de l'élevage, sont restés en cuves, nous n'avons décelé aucun des composés. Par contre, dans les mêmes vins qui ont été au contact du bois on trouve du furfural, du méthyl-5 furfural, de la γ -lactone ainsi que de l'alcool furfurylique, substance qui n'avait pas été décelée dans les solutions de macération des bois. Cet alcool ne serait donc pas issu directement du bois. Il pourrait avoir pour origine la transformation chimique ou biochimique d'une substance cédée par le bois.

TABLEAU III

Teneurs en substances volatiles provenant du chêne dans les vins et des macérations hydroalcooliques de bois.

Les chiffres représentent de mg par litre.

	Vin rouge		Vin blanc		Macération bois	
	n° 1	n° 2	n° 3	n° 4	non brûlé	brûlé
Fermentation	cuve inox	oui	oui	oui	non	
	barrique	non	non	non	oui	
Élevage barrique	non	10 mois	non	2 mois		
Furfural	0	0,69	0	0,44	0,40	58
Méthyl-5 furfural	0	0,20	0	0,14	0	6,50
Alcool furfurylique	0	4,08	0	2,11	0	0
Cis « γ -lactone» (1)	0	0,05	0	0,09	0,71	0,38
Trans « γ -lactone» (1)	0	0,10	0	0,15	5,21	2,63

(1) La méthode utilisée et nos connaissances actuelles ne nous permettent pas d'affirmer la configuration cis ou trans.

CONCLUSION

La méthode mise au point pour le dosage de différentes substances issues de bois de chêne est rapide, reproductible et d'une bonne sensibilité. Les premiers résultats obtenus sur des solutions dans lesquelles ont macéré des morceaux de bois brûlés ou non brûlés montrent que le brûlage entraîne, d'une part la formation de furfural et de méthyl-5 furfural et

d'autre part la diminution de la teneur en γ -lactone. Ces mêmes substances se retrouvent dans les vins à des concentrations variables selon la nature des bois.

Nous avons constaté la présence d'alcool furfurylique dans les vins élevés en barriques de chêne et son absence dans les solutions de macération des morceaux de bois brûlé et non brûlé. Cet alcool pourrait être formé par voie biochimique à partir d'un précurseur présent dans le bois. Une étude est en cours pour vérifier cette hypothèse.

Cette méthode de dosage devrait, dans l'avenir, permettre d'améliorer nos connaissances sur les caractères organoleptiques des vins en contact avec le bois de chêne.

Remerciements

Les auteurs remercient la Société SEGUIN-MOREAU (Cognac) sans laquelle cette étude n'aurait pas pu être effectuée, le Docteur G. BOURGEOIS du CESAMO, Université de Bordeaux I, qui les a aidés dans la réalisation et l'interprétation des spectres de masse ainsi que la Société FONTAROME (Grasse) qui leur a fourni gratuitement la β -méthyl γ -octalactone.

Manuscrit reçu le 26 janvier 1987 ; accepté pour publication le 9 mars 1987.

RÉSUMÉ

Une méthode de dosage par chromatographie en phase gazeuse de substances cédées par le bois de chêne (furfural, méthyl-5 furfural, alcool furfurylique, *cis* et *trans* β -méthyl γ -octalactone) est mise au point. On suit l'évolution de ces substances dans les solutions synthétiques et dans les vins.

SUMMARY

A gas-liquid chromatography method for determination of volatile compounds of oak wood barrels (furfural, 5-methyl furfural, furfuryl alcohol, *cis* and *trans* β -methyl γ -octalactone) is described. We study the evolution of these substances in synthetic solutions and wines.

ZUSAMMENFASSUNG

Mittels Gaschromatographie wurde eine Methode entwickelt um die Stoffe zu bestimmen, welche während dem Ausbau vom Wein abgegeben werden. Es handelt sich um folgende Stoffe: Furfural, Methyl-5-Furfural, Furfuryl-Alkohol, und die Formen *cis* und *trans* des sog. Whisky-Laktone.

RESUMEN

Se describe aquí un método de análisis, por cromatografía de gases, de sustancias procedentes de las barricas de roble (furfural, metil-5 furfural, alcohol furfurílico, *cis* y *trans* β -metil γ -octalactona). Se estudia la evolución de estas sustancias en soluciones sintéticas y vinos.

RIASSUNTO

Un metodo di dosaggio con cromatografia in fase gassosa di sostanze liberate dal legno di quercia (furfurale, metile 5 furfurale, alcol furfurilico, *cis* e *trans* β -metile γ -octalactone) é messo a punto. Seguiamo l'evoluzione di queste sostanze in soluzioni sintetiche e nei vini.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHAUDHARY S.-S., WEBB A.-D. et KEPNER R.-E., 1968. GLC investigation of the volatile compounds in extracts from Sauvignon blanc wines from normal and botrytised grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **19**, 6-12.
- DUBOIS P., 1984. Quelques résultats concernant les constituants volatils des vins. *Revue Fr. CEnol.*, **93**, 59-63.
- FEUILLAT M., 1982. L'élevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne. *Revue Fr. CEnol.*, **88** bis, 17-29.
- KEPNER R., WEBB A.-D. et MULLER C.-J., 1972. Identification of 4-hydroxy 3-methyl octanoic gamma lactone as a volatile compound of oak wood aged wines of *Vitis vinifera* var. Cabernet-Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23**, 3, 103-105.
- MASUDA M. et NISHIMURA K., 1971.1 Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochem.*, **10**, 1401-1402.
- NAUDIN R., 1986 a. Conservation et élevage des vins. Elevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne. *Rev. CEnol. de Bourgogne*, **41**, 11-15.
- NAUDIN R., 1986 b. Conservation et élevage des vins. Elevage des vins de Bourgogne en fûts de chêne. *Revue CEnol. de Bourgogne*, **42**, 7-14.
- NYKANEN M. et SUOMALAINEN H., 1983. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht (Pays-Bas).
- OTSUKA K., ZENIBAYASHI Y., ITOH M. et TOTSUKA A., 1974. Presence and signifiante of two diastereoisomers of β -methyl γ -octalactone in aged distilled liquors. *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 3, 485-490.
- PIGOTT J.-R., 1983. The flavour of distilled beverages. Ellis Horwood Ltd, Chichester (Grande-Bretagne).
- PUECH J.-L., LEAUTE R., CLOT G., NOMDEDEU L. et MONDIES H., 1984. Evolution de divers constituants volatils et phénoliques des eaux-de-vie de Cognac au cours de leur vieillissement. *Sc. des Alim.*, **4**, 65-80.
- STERN D.-J., GUADAGNI D. et STEVENS K.-L., 1975. Aging of wine: Qualitative change in the volatiles of Zinfandel wine during two years. *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**, n° 4, 208-213.