Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1996, **30**, N°1, 23-29

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE DOSAGE DE LA 4-MERCAPTO-4-MÉTHYLPENTAN-2-ONE DANS LES VINS DE SAUVIGNON

QUANTITATIVE DETERMINATION OF 4-MERCAPTO-4-METHYLPENTAN-2-ONE IN SAUVIGNON WINES

Patricia BOUCHILLOUX, Ph. DARRIET et D. DUBOURDIEU

Faculté d'Œnologie, 351 cours de la Libération
33405 Talence cedex (France)

Résumé : Nous proposons une méthode de dosage d'un constituant majeur de l'arôme variétal des vins de Sauvignon. La 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) est extraite en utilisant une technique dite de « dynamic headspace ». Les teneurs en mercaptocétone sont déterminées par analyse chromatographique en phase gazeuse avec une détection spécifique des composés soufrés par photométrie de flamme.

Abstract : 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP), a powerful aromatic component from Sauvignon variety, is present at trace levels in the wines from this cultivar. A method is proposed to measure the amount of 4MMP in Sauvignon wines. It combines the extraction of wines volatile constituents using a dynamic headspace technique and the selective reaction between thiols and p-hydroxymercuribenzoate (pHMB). This combination is reversible in presence of an excess of cystein or glutathione. Finally, the organic extract is injected on a gas chromatograph coupled with a flame photometric detector.

Using this method, 4MMP content in Sauvignon wines can be determined with good repetability and sensitivity. These results enable us to evalue the incidence of viticultural and œnological aspects on the level of this aromatic component in Sauvignon wines.

Mots-clés : Sauvignon, arôme variétal, 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP), p-hydroxymercuribenzoate (pHMB).

Keywords : Sauvignon, varietal aroma, 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP), p-hydroxymercuribenzoate (pHMB).

INTRODUCTION

Les vins de Sauvignon développent souvent des arômes intenses dont les nuances caractéristiques, allant de registres herbacés à fruités, sont bien reconnues des dégustateurs.

Au cours des dix dernières années, notre connaissance a progressé sur la nature des constituants responsables de l'arôme caractéristique des vins de Sauvignon. Certaines méthoxypyrazines, la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine en particulier, ont été identifiées dans les vins de ce cépage (AUGUSTYN et *al.* 1982 ; ALLEN et *al.*, 1991). Une méthode de dosage de ces composés dans les vins de Sauvignon a été mise au point (HARRIS et *al.*, 1987), et la contribution de la 2-méthoxy-3-isobutylpyrazine à l'arôme herbacé de certains vins de Sauvignon est maintenant bien établie (ALLEN et *al.*, 1991 ; LACEY et *al.*, 1991 ; ALLEN et *al.*, 1993).

Par ailleurs, il a été montré que certains thiols, présents à l'état de traces dans les vins de ce cépage, jouent un rôle majeur dans leur arôme variétal (DARRIET, 1993 ; DUBOURDIEU et DARRIET, 1993). A ce jour, deux d'entre eux ont été identifiés. Il s'agit de la 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (4MMP) (DARRIET et *al.*, 1995) et du 3-mercaptohexanol (TOMINAGA et *al.*,1995).

La 4MMP est un composé très odorant caractérisé par une odeur de buis (seuil de perception olfactive dans le vin : 3 ng/l). Cependant, jusqu'à ce jour, hor-

mis l'appréciation de sa teneur dans les vins par méthode de couplage CPG-olfactométrie (DARRIET et *al.*, 1991), il n'était pas possible de doser ce composé dans les vins.

Les méthodes de dosage spécifiques des thiols signalées sont peu nombreuses. Certains auteurs proposent la silylation de mercaptans à l'aide de ter-butyldiméthylsilyl-thioéthers (LANDRUM et MAWHINNEY, 1989), d'autres une extraction sélective des thiols avec le N-éthylmaléimide, réaction réversible par électrolyse (NISHIYAMA et KUNINORI, 1992), voire leur combinaison spécifique avec le mercure par percolation sur une colonne de silice greffée avec l'acétate de mercure (CHMIELOWIEC, 1981). Cependant, aucune de ces méthodes ne semblait directement applicable au dosage des thiols à l'état de traces dans les vins.

La méthode que nous proposons couple l'extraction de la 4MMP dans les vins par entraînement des vapeurs de l'espace de tête à l'azote (technique générale d'extraction par un gaz nommée dans certaines publications : « dynamic headspace ») avec la combinaison covalente, réversible et spécifique de ce thiol avec un composé organomercurique, le p-hydroxymercuribenzoate. Il devient ainsi possible de doser ce composé dans les vins de Sauvignon avec un mode de détection physique. Cette méthode est appliquée à la détermination des teneurs en 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one dans les vins.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

I — PRINCIPE

Les thiols volatils sont entraînés par un courant continu d'azote et piégés spécifiquement par un composé organomercurique : le p-hydroxymercuribenzoate (pHMB). Cette combinaison est réversible en présence d'un excès de thiol non volatil (DARRIET et *al.*, 1995).

Après concentration, l'extrait organique de la fraction décombinée est analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec détection spécifique des composés soufrés par photométrie de flamme (FPD).

II — MONTAGE D'ENTRAINEMENT ET DE PIÉGEAGE SÉLECTIF DES THIOLS

Le montage utilisé pour l'extraction par entraînement des vapeurs de l'espace de tête à l'azote est constitué d'un récipient de 2 litres en verre Pyrex muni à 2 cm de sa base d'un fritté de porosité 3 et d'épaisseur 0,5 cm (figure 1). Ce flacon est partiellement immergé dans un bain-marie thermostaté pendant toute la durée de l'extraction.

Un courant d'azote, dont le débit est contrôlé par un débitmètre de précision (Sho-rate, Rosemount, France), pénètre à la base de ce récipient et se trouve distribué de manière homogène dans la partie supérieure du flacon en traversant le fritté de porosité 3.

A la sortie supérieure du récipient, le courant canalisé dans une tubulure en verre va barbotter (à travers un fritté de porosité 3) dans la solution de pHMB placée dans un récipient teinté maintenu à 0°C.

Le système étanche est relié à un réfrigérant à boules dans lequel circule de l'éthylène glycol refroidi à 0°C par un cryostat (Chrompack, Middelburg, Pays-Bas).

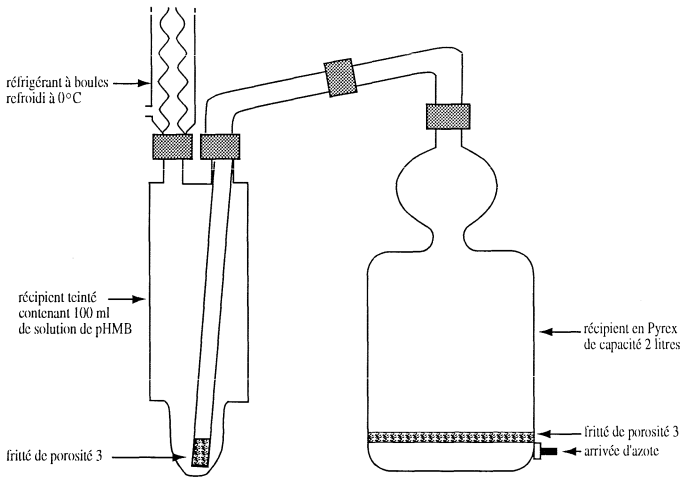


Fig. 1 — Appareil d'entraînement et de piégeage sélectif des thiols

III — RÉACTIFS ET SOLUTIONS

a) p-hydroxymercuribenzoate

Dans une fiole jaugée de 100 ml, à l'abri de la lumière, 18 mg d'acide p-hydroxymercuribenzoïque (Sigma Chemicals, St-Louis, MO, USA) sont additionnés de 2,5 ml d'hydroxyde de sodium 0,05 N. Après dissolution des cristaux, le volume de la solution est ajusté à 100 ml par ajout d'eau ultrapure (Millipore, Bedford, USA). La solution de pHMB à 0,5 mM est homogénéisée par agitation magnétique.

b) Etalon interne

L'étalon interne, le 1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol (133MMB), est obtenu par synthèse à un degré de pureté de 63,9 p. 100. Une solution à 2 mg/l est préparée par dilution directe du composé de synthèse dans de l'eau ultrapure.

Cette solution est ensuite stockée dans un pilulier teinté, scellé, après saturation de l'espace de tête, à l'azote.

c) Solutions de référence de 4MMP

Les solutions de 4MMP sont préparées par dilution dans de l'eau ultrapure à partir d'une solution commerciale de 4-mercapto-4-méthylpentan-2-one (CA 19872-52-7) à 0,465 p.100 dans le polyéthylène glycol (Interchim, Montluçon, France).

La proportion de cette mercaptocétone dans la solution commerciale a été déterminée grâce à la méthode d'Ellman (1955), en utilisant le 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB), (DARRIET et *al.*, 1995).

IV — ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

Les principaux paramètres des analyses par CPG-FPD et CPG-Spectrométrie de masse (SM) sont décrits dans le tableau I. Dans le cas de l'analyse par CPG-SM, le gaz vecteur est l'Hélium (He N 55, Air Liquide, pression = 20 psi).

TABLEAU I

Conditions d'analyse chromatographique

Chromatographe HP 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, Pa, USA)	
Gaz vecteur	- Hydrogène U (Air Liquide, France) - pression en tête de colonne : 20 psi - débit en tête de colonne : 1,54 ml/mn à 35°C
Injection	- mode splitless - température : 230°C - temps de fermeture des vannes : 1 mn - quantité injectée : 3 µl
Colonne capillaire	- type Carbowax 20M (BP 20, SGE, Glen Osmond, Australie) - longueur : 50 m - diamètre intérieur : 0,25 mm - 0,25 µm d'épaisseur de film
Programme de température	- 35°C pendant 1 mn - 3°C/mn de 35°C à 230°C - isotherme à 230°C pendant 15 mn
Détecteur à photométrie de flamme HP-19256A (Hewlett-Packard)	
-détecteur calé sur la longueur d'onde spécifique du soufre : $\lambda = 393$ nm -température : 200°C -débits :	$H_2 = 90$ ml/mn $O_2 + N_2$ (20/80) = 76 ml/mn $N_2 = 38$ ml/mn (CHATONNET et *al.*, 1992).
Acquisition des données	
- station d'intégration de données HP 3365 (Hewlett-Packard) - intégrateur HP 3395 (Hewlett-Packard)	
Spectromètre de masse HP-5972	
(Hewlett-Packard, Mass Selective Detector, 70 eV, mode impact électronique)	

V — MODE OPÉRATOIRE

100 ml de solution de pHMB sont placés dans le récipient teinté maintenu à 0°C.

500 ml de vin sont centrifugés (5000 g, 10 mn, 4°C) si nécessaire afin que la turbidité soit inférieure à 4 NTU (unité de turbidité néphélométrique). On a observé en effet que les vins clarifiés sont mieux extraits que les vins troubles. L'étalon interne (100 µl) est ajouté avant introduction du vin dans l'appareillage d'extraction que l'on dispose alors dans le bain-marie à 92°C. Dans des expériences préliminaires, il a été constaté que la 4MMP n'était pas dégradée par chauffage à 92°C pendant 120 minutes (BOUCHILLOUX, 1995). Le montage du système terminé, le courant d'azote est fixé à un débit continu de 785 ml/mn.

Après 120 minutes d'entraînement des vapeurs de l'espace de tête à l'azote, la solution pHMB-thiols est versée dans un ballon d'évaporation de 1000 ml puis évaporée à sec sous pression réduite, à 40°C, à l'abri de la lumière.

Le résidu sec est remis en solution dans 100 ml d'eau ultrapure puis placé dans un erlenmeyer de 250 ml à l'abri de la lumière.

Le pH de la solution est ajusté à 6 par ajout de quelques gouttes de solution d'hydroxyde de sodium 0,05 N, puis à 7,5 à l'aide d'une solution de tampon phosphate 0,1 M, pH 8.

308 mg de glutathion (98 p. cent, Aldrich-Chimie, Steinheim) ou 121 mg de L-cystéine (97 p. cent, Aldrich-Chimie, Steinheim), correspondant à vingt fois la molarité de la solution de pHMB, sont directement versés dans la solution. Le milieu réactionnel est agité à 400 r.p.m. pendant 30 minutes, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

On réalise ensuite trois extractions successives par 10, 5 et 5 ml d'un mélange de dichlorométhane (Atrasol, SDS) et de pentane (Atrasol, SDS) dans les proportions 1:2 (v/v) : les échantillons sont soumis à 5 minutes d'agitation à 700 r.p.m, puis sont décantés pendant 5 minutes dans une ampoule de 250 ml.

Les phases organiques sont rassemblées dans un pilulier, séchées à l'aide de sulfate de sodium anhydre (E. Merck, Darmstadt), puis concentrées à 100 µl sous un courant d'azote (débit : 100 ml/mn).

3 µl de l'extrait organique concentré sont injectés en CPG couplée à un mode de détection par photométrie de flamme.

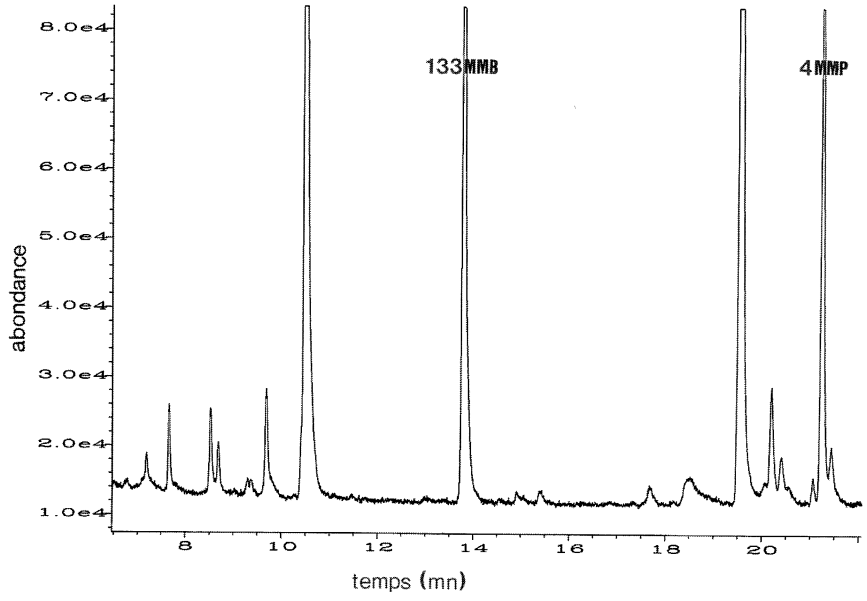


Fig. 2 — Chromatogramme obtenu par couplage CPG-photométrie de flamme

RÉSULTATS

I — DÉTECTION DE LA 4MMP DANS UN VIN DE SAUVIGNON

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse avec un mode de détection spécifique des composés soufrés d'un extrait de vin de Sauvignon réalisé selon la méthode présentée permet d'obtenir sur le chromatogramme (figure 2) un pic au temps de rétention de la 4MMP (21,2 minutes).

L'identification de la 4MMP dans l'extrait de vin de Sauvignon peut être confirmée par couplage CPG-olfactométrie et par couplage CPG-spectrométrie de masse (extrait concentré à 10 µl) avec la mise en évidence au temps de rétention de ce composé des ions majeurs de son spectre de masse (132, 99, 75, 59) (DARRIET et *al.*, 1995).

Sur le même chromatogramme (figure 2), un pic bien individualisé au temps de rétention 13,8 minutes correspond à l'étalon interne (133 MMB).

II — RÉPÉTABILITÉ DE L'ANALYSE

La répétabilité de la méthode de dosage de la 4MMP a été étudiée pour deux séries d'échantillons, R1 et R2, correspondant à des vins de Sémillon additionnés respectivement de 26 ng/l et 8 ng/l de 4MMP.

La répétabilité du dosage est étudiée pour une population de quatre échantillons dans le cas de la série R1, et pour une population de cinq échantillons dans le cas de la série R2 (tableaux II et III).

TABLEAU II

Répétabilité du dosage, série R1

Série R1	4MMP (ng/l)
R11	22,9
R12	25,2
R13	27,5
R14	22,7
Moyenne	24,6
Ecart-type	2,26
Coefficient de variation (%)	9,2

4MMP/ei : rapport de surface du pic de 4MMP à la surface du pic d'étalon interne

TABLEAU III

Répétabilité du dosage, série R2

Série R2	4MMP (ng/l)
R21	7
R22	6,8
R23	6
R24	6,8
R25	7,5
Moyenne	6,8
Ecart-type	0,54
Coefficient de variation (%)	8

4MMP/ei : rapport de surface du pic de 4MMP à la surface du pic d'étalon interne

Le coefficient de variation obtenu à partir des résultats d'analyse des séries R1 et R2 est compris entre 8 et 9,2 p. cent.

Pour vérifier que la nature du vin analysé n'a pas d'incidence significative sur la détermination des teneurs en 4MMP par cette méthode, une quantité identique de ce composé (15 ng/l) a été rajoutée à trois échantillons différents de 500 ml de vin qui en étaient dépourvus à l'origine. Ces vins sont analysés selon les conditions présentées dans le chapitre Matériel et Méthode.

La comparaison des résultats de l'analyse de ces trois échantillons (tableau IV) met en évidence un coefficient de variation de 5 p.100, valeur comparable à celles obtenues avec les séries R1 et R2.

TABLEAU IV

Répétabilité du dosage de la 4MMP dans différents vins

	4MMP (ng/l)
Muscadet de Sèvre et Maine (1994)	13
Vin de table (1994)	12
Bordeaux blanc sec (1982)	13,2
Moyenne	12,7
Ecart-type	0,64
Coefficient de variation (%)	5

4MMP/ei : rapport de surface du pic de 4MMP à la surface du pic d'étalon interne

III — LINÉARITÉ ET SENSIBILITÉ DE LA MESURE

Des ajouts de 4MMP dans une gamme de concentration située entre 13 et 40 ng/l ont été effectués dans des vins de Sémillon.

La figure 3 met en évidence que, dans nos conditions d'analyse, le rapport à l'étalon interne de la surface du pic de 4MMP varie linéairement en fonction de la teneur de ce composé dans les vins avec un coefficient de corrélation de 99 p. cent.

Dans nos conditions d'analyse, la sensibilité du dosage de la 4MMP dans les vins est de l'ordre de 5 ng/l.

IV — APPLICATIONS : DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN 4MMP DANS LES VINS DE SAUVIGNON

Nous avions estimé la teneur en 4MMP dans les vins de Sauvignon par couplage CPG-olfactométrie

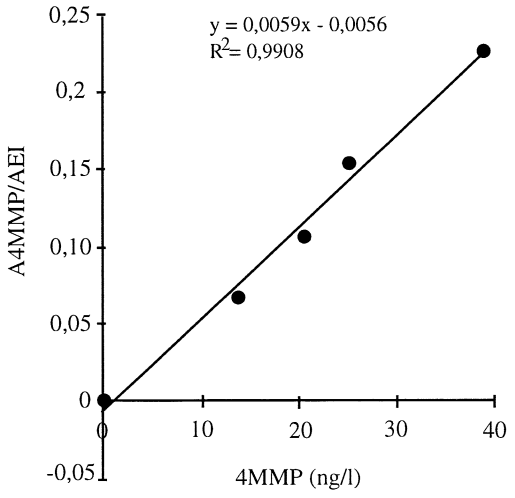


Fig. 3 — Rapport à l'étalon interne de la surface du pic de 4MMP en fonction de sa concentration dans le vin

dans une gamme de concentration située entre quelques nanogrammes par litre et une quinzaine de nanogrammes par litre (DARRIET et *al.*, 1995) Cette détermination était basée sur l'appréciation de la durée de perception de la 4MMP. Le dosage de la 4MMP confirme globalement les résultats obtenus à partir des mêmes vins par couplage CPG-olfactométrie (figure 5).

Dans des vins de Bordeaux et de Bergerac de différents millésimes, les teneurs en 4MMP ont pu être déterminées par la méthode proposée jusqu'à 35 ng/l (tableau V).

Ces valeurs sont, dans la majorité des cas, supérieures au seuil de perception olfactive, déterminé dans les vins à une concentration de 3 ng/l, ce qui confirme l'incidence de cette mercaptocétone dans l'arôme variétal des vins de Sauvignon.

TABLEAU V

Typicité variétale perçue à la dégustation et teneurs en 4MMP (ng/l) de différents vins

Vins	Typicité à la dégustation	Teneurs en 4MMP en ng/l
Cru A Bx bl. sec 1993	très typé	34
Cru A Bx bl. sec 1992	peu typé	8,5
Cru A Bx bl. sec 1990	non typé	0
Cru B Bx bl. sec 1993	très typé	34
Cru C Bgc bl. sec 1993	typé	18

Bx bl. sec : Bordeaux blanc sec
Bgc bl. sec : Bergerac blanc sec

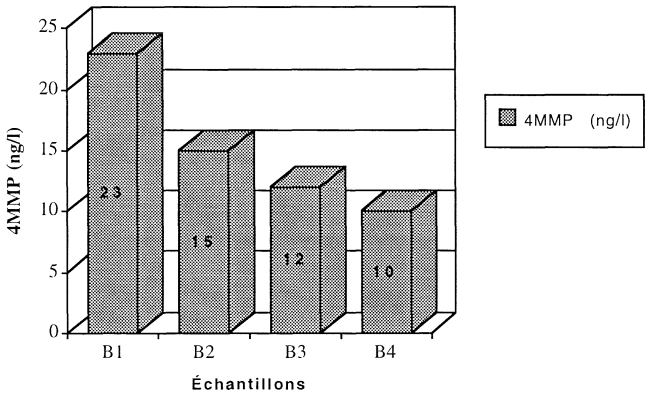


Figure 5a — Dosage de la 4MMP dans les vins par couplage CPG-FPD

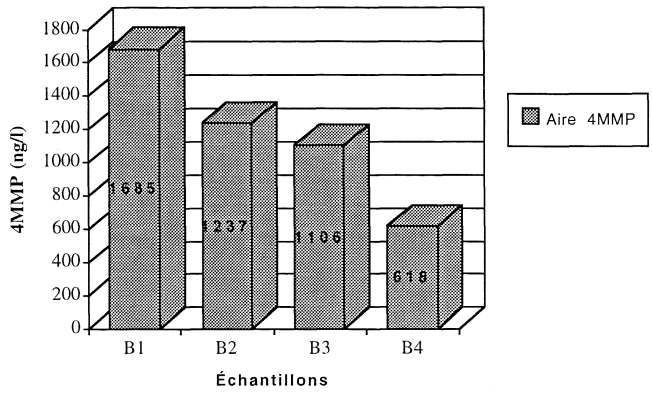


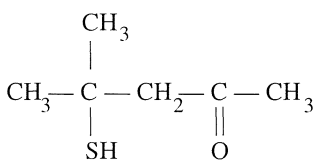
Figure 5b — Evaluation des teneurs en 4MMP dans les vins par couplage CPG-olfactométrie

DISCUSSION - CONCLUSION

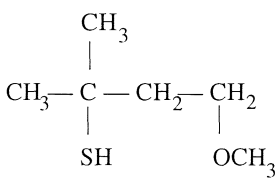
Le procédé d'entraînement des vapeurs de l'espace de tête à l'azote proposé permet de réaliser assez facilement l'extraction de la 4MMP contenue dans le vin. Dans nos conditions d'analyse, l'extraction de ce composé est complète, sans risque de dégradation (BOUCHILLOUX, 1995). La sélectivité du piégeage réversible des thiols par le pHMB permet d'optimiser l'extraction du mercaptan à partir du milieu complexe que constitue le vin.

Grâce à la sensibilité de la détection par photométrie de flamme, il est possible, à partir d'un extrait organique concentré, d'obtenir un pic de 4MMP suffisamment important pour être quantifié.

L'étalon interne, le 133MMB, constituant naturel du bourgeon de cassis (RIGAUD et *al.*, 1986), possède une odeur et une structure chimique voisines de la 4MMP. De ce fait, la bonne répétabilité du dosage et la linéarité de la courbe d'étalonnage obtenue dans la gamme de concentrations étudiée s'expliquent vraisemblablement par les propriétés physico-chimiques proches des deux mercaptans.



4-mercapto-4-méthylpentan-2-one



1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol

Pour une série d'échantillons donnée, on observe une bonne correspondance entre les durées de perception de la zone odorante concernée en CPG-olfactométrie et les teneurs en 4MMP déterminées par la méthode proposée.

En conclusion, sensible et reproductible, la méthode décrite et évaluée dans ce travail permet l'appréciation objective d'un constituant aromatique exerçant une influence déterminante sur l'arôme des vins de Sauvignon. Elle constituera un outil nouveau pour étudier l'incidence de paramètres œnologiques et viticoles sur la typicité aromatique des vins de Sauvignon.

Remerciements :

Nous remercions Monsieur Patrick Etiévant (INRA, Dijon) qui nous a procuré le 1-méthoxy-3-méthyl-3-butanethiol synthétisé dans son laboratoire, ainsi que le CIVB (Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux) pour son support financier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLEN M.S., LACEY M.J., HARRIS R.L.N. and BROWN W.V., 1991. Contribution of Methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine Aroma. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, n°2, 109-112.

ALLEN M.S. and LACEY M.J., 1993. Methoxypyrazine grape flavour : influence of cultivar and viticulture. *Vitic. Enol. Sci.*, **48**, 211-213.

AUGUSTYN O.P.H., RAPP A. et VAN WYK C.J., 1982. Some volatile aroma components of *Vitis vinifera* L.cv. Sauvignon blanc. *South Afric. J. Enol. Vitic.*, **3**, n°2, 53-60.

BOUCHILLOUX P., 1995. Mise au point d'une méthode de dosage de la 4-méthyl-4-mercaptopentan-2-one. *D.E.A.*, Université de Bordeaux II.

CHATONNET P., LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1992. Identification et dosage de sulfures volatils lourds dans les vins par chromatographie en phase gazeuse et photométrie de flamme. *Sci. Alim.*, **12**, 513-532.

CHMIELOWIEC J., 1981. Organomercuric bonded phase for high performance liquid chromatography separations of p-electron-, sulfur-, oxygen-, and nitrogen-containing compounds. *J. Chromato. Sci.*, **19**, 296-307.

DARRIET Ph., LAVIGNE V. et DUBOURDIEU D., 1991. Caractérisation de l'arôme variétal des vins de Sauvignon par couplage CPG-Olfactométrie. *J. Int. Sci. Vigne Vin,* **25**, n°3, 167-174.

DARRIET Ph., 1993. L'arôme et les précurseurs d'arôme du Sauvignon. *Thèse de Doctorat.* Université de Bordeaux II.

DARRIET Ph., TOMINAGA T., LAVIGNE V., BOIDRON J.-N. et DUBOURDIEU D., 1995. Identification of a powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L.var. Sauvignon wines : 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour fragrance Journal*, **10**, 385-392.

DUBOURDIEU D. et DARRIET P., 1993. Recherches sur l'arôme variétal du Sauvignon. Mise en évidence dans les vins des composés soufrés à fort pouvoir odorant formés au cours de la fermentation alcoolique à partir de précurseurs non volatils du moût. *Connaissance des cépages et qualités des vins, Symp. Int.*, Montpellier, 10 février.

HARRIS R.L.N., LACEY M.J., BROWN W.V. and ALLEN M.S., 1987. Determination of 2-methoxy-3-alkylpyrazines in wine by gaz chromatography-mass spectrometry. *Vitis*, **26**, 201-207.

LACEY M.J., ALLEN M.S., HARRIS R.L.N. and BROWN W.V., 1991. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, n°2, 103-108.

LANDRUM D.C. and MAWHINNEY T.P., 1989. Gas-liquid chromatography-mass spectrometry of mono- and dithiols as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr.*, **483**, 21-32.

NISHIYAMA J. and KUNINORI T., 1992. Assay of thiols and disulfides based on the reversibility of N-ethylmaleimide alkylation of thiols combined with electrolysis. *Analytical Biochemistry*, **200**, 230-234.

RIGAUD J., ETIÉVANT P., HENRY R. et LATRASSE A., 1986. Le méthoxy-4-méthyl-2-butanethiol-2, un constituant majeur de l'arôme du bourgeon de cassis (*Ribes nigrum* L.). *Sci. Alim.*, **6**, 213-220.

TOMINAGA T., MASNEUF I. et DUBOURDIEU D., 1995. Des conjugués de la cystéine, précurseurs de certains arômes variétaux du Sauvignon. *5e Symp. Int. Œnol.*, 15-17 Juin 1995, Bordeaux.

Manuscrit reçu le 18 décembre 1995 ;
accepté pour publication le 29 janvier 1996