Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1994, **28**, N°3, 267-273

DOSAGE FLUORIMÉTRIQUE DE L'ACÉTOÏNE DANS LE VIN

A.N. VOULGAROPOULOS* et Th. SOULIS**

*Laboratoire de Chimie Analytique de l'Université d'Aristote de Thessaloniki, 54006 Thessaloniki (Grèce)
**Laboratoire de Chimie et de Technologie des Aliments de l'Université d'Aristote de Thessaloniki, 54006 Thessaloniki (Grèce)

Résumé : *Les auteurs proposent une technique analytique de dosage de l'acétoïne dans les vins après oxydation en diacétyle et condensation de ce dernier avec le diamineanisol-3,4. Le produit de condensation émet une forte fluorescence à partir de laquelle on peut calculer la concentration de l'acétoïne dans le vin. La méthode proposée est simple, sensible, fiable et spécifique.*

INTRODUCTION

Le goût (RADLER, 1962), l'odeur (GUYMON et CROWELL, 1965) et les concentrations de l'acétoïne dans les vins sont faibles (de 2 à 80 mg l^{-1}), aussi son influence sur les caractères organoleptiques des vins est négligeable. Son intérêt réside dans le fait que ce composé se transforme facilement en diacétyle, substance dont le seuil de perception est très faible (RADLER, 1962 ; RANKINE et *al.*, 1969 ; TYURIN et *al.*, 1983).

Des teneurs élevées en acétoïne ont été trouvées dans des vins de table (GUYMON et CROWELL, 1965), des vins de Xérès (AMERINE et *al.*, 1967), des vins où l'on a ajouté de l'éthanal pendant la fermentation alcoolique (AMERINE et *al.*, 1967 ; GUYMON et CROWELL, 1965), ou bien dans des vins dont la fermentation alcoolique a été effectuée à une température élevée (AMERINE et *al.*, 1967) ou altérés par la piqûre acétique (AMERINE et *al.*, 1967 ; GUYMON et CROWELL, 1965). La fermentation malolactique peut être à l'origine de teneurs élevées en acétoïne (AMERINE et *al.*, 1967 ; FORNACHON et LLOYD, 1965 ; RADLER, 1962 ; RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1972) ; la concentration en acétoïne est influencée par l'espèce des microorganismes qui effectuent la fermentation (FORNACHON et LLOYD, 1965 ; PEYNAUD, 1980; SHINOHARA et *al.*, 1979).

Dans les eaux-de-vie, la concentration de l'acétoïne dépend de la composition initiale du vin et de la méthode de distillation et permet la distinction entre une eau-de-vie provenant d'une double distillation ou d'une distillation d'un seul jet (RENOUIL, 1962).

Le point sur la formation de l'acétoïne et les autres produits secondaires des fermentations alcoolique et malolactique a fait l'objet d'un récent travail (REVEL et *al.*, 1989)

L'acétoïne peut être dosé dans les vins et les distillats par différentes méthodes : spectrophotométriques (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1972), colorimétriques (OUGH et AMERINE 1967 ; RANKINE et *al.*, 1969 ; RONKAINEN et *al.*, 1970), chimiques (AMERINE et OUGH, 1974), voltampérométriques (LECHNER et *al.*, 1981) et chromatographiques (POSTEL et GÜNENC, 1976).

Dans une précédente publication (VOULGAROPOULOS et SOULIS, 1991), nous avons mis au point une technique de dosage fluorimétrique du diacétyle. Dans ce travail, nous proposons une technique de dosage de l'acétoïne, sensible et spécifique, basée sur l'oxydation de l'acétoïne en diacétyle à l'aide de chlorure ferrique (RIBÉREAU-GAYON et *al.*, 1972) et sa condensation ultérieure avec le diamineanisol-3,4. Le produit de condensation présente une forte fluorescence dont l'intensité est fonction de la concentration en diacétyle et on calcule ensuite la teneur en acétoïne.

La méthode proposée, comparée à celles citées plus haut, est plus spécifique et plus sensible. De plus, comparée à la méthode chromatographique, elle exige un investissement en matériel d'un montant très nettement plus faible (RIBÉREAU GAYON et al., 1975).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — APPAREILLAGE

Fluorimètre Perkin - Elmer Modèle 3000

Conditions de fonctionnement de l'appareil :

- longueur d'onde d'excitation : 345 nm,
- longueur d'onde d'émission : 395 nm,
- fente d'excitation : 15,
- fente d'émission : 5,
- fente d'expansion : x20.

II — RÉACTIFS

Diaminanisol-3,4 et acétoïne (Société Aldrich).

Diacétyle (puriss, Société Fluka).

L'eau utilisée pour la préparation des solutions est distillée deux fois et conservée en flacons de polyéthylène.

III — SOLUTIONS

Solution de diaminanisol-3,4 : Dans un bécher de 50 ml, on dissout 0,0053 g de dichlo-

ride de diamineanisol-3,4 dans 2 ml d'hydroxyde de sodium 0,5 M et 10 ml d'éthanol absolu. Le contenu du bécher est transvasé quantitativement dans une fiole jaugée de 25 ml, on rince à plusieurs reprises avec de l'eau distillée et on complète au trait de jauge.

Mélange éthanol-eau : Dans une fiole jaugée d'un litre, on place 110 ml d'éthanol absolu et on complète au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Solutions étalons de diacétyle : une solution mère de 36 mg de diacétyle dans un litre d'un mélange éthanol-eau est préparée. A partir de cette solution on prépare, par dilutions successives, les solutions étalons.

Remarque : Le diacétyle utilisé doit être récemment distillé.

IV — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les analyses sont effectuées sur des vins rouges et rosés du commerce provenant des régions de Naoussa, de Zakynthos et de Crète.

IV — MODE OPÉRATOIRE

1°) Distillation du diacétyle

Distiller 10 ml de vin par entraînement à la vapeur. Recueillir dans une fiole jaugée exactement 100 ml de distillat qui seront utilisés pour doser le diacétyle.

2°) Oxydation de l'acétoïne en diacétyle

Placer dans un ballon de 100 ml à col long pour pouvoir faire reflux, 10 ml du même vin. Ajouter 2 ml de la solution de chlorure ferrique, 25 ml de la solution de sulfate ferreux et 0,5 ml d'acide sulfurique à 15 p. 100. Adapter un réfrigérant descendant. Chauffer doucement à reflux pendant 20 minutes ; il faut maintenir une très légère ébullition telle que les vapeurs se condensent dans le col du ballon et non dans le réfrigérant descendant. Engager l'extrémité du tube réfrigérant dans une fiole jaugée de 100 ml contenant quelques millilitres de la solution éthanol-eau. Elever la température et distiller une dizaine de ml en 5 minutes. Après refroidissement, compléter au trait de jauge avec le mélange éthanol-eau ; on a dans la fiole jaugée le diactéyle initialement présent dans le vin et celui formé à partir de l'acétoïne.

3°) Condensation du diacétyle avec le diamineanisol-3,4

Dans un ballon de 50 ml, on place 2 ml du premier distillat et on ajoute 1 ml d'une solution de diamineanisol-3,4 et 10 ml du mélange éthanol-eau. On chauffe à ébullition sous reflux pendant 40 minutes, on refroidit ; le contenu est transvasé dans une fiole jaugée de 25 ml, on complète au trait avec le mélange éthanol-eau.

On opère de la même façon pour le second distillat.

On effectue un essai à blanc, dans les mêmes conditions, sans distillat.

On mesure l'intensité de la fluorescence à 395 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 345 nm. La concentration en acétoïne s'obtient en multipliant par 1,023 la teneur en diacéthyle déterminée par différence entre les valeurs trouvées avant et après oxydation du vin.

$$\frac{\text{P.M. d'acétoïne}}{\text{P.M. de diacétyle}} = \frac{88}{86} = 1{,}203$$

La figure 1 montre les courbes obtenues à partir des valeurs trouvées par la méthode des ajouts dosés.

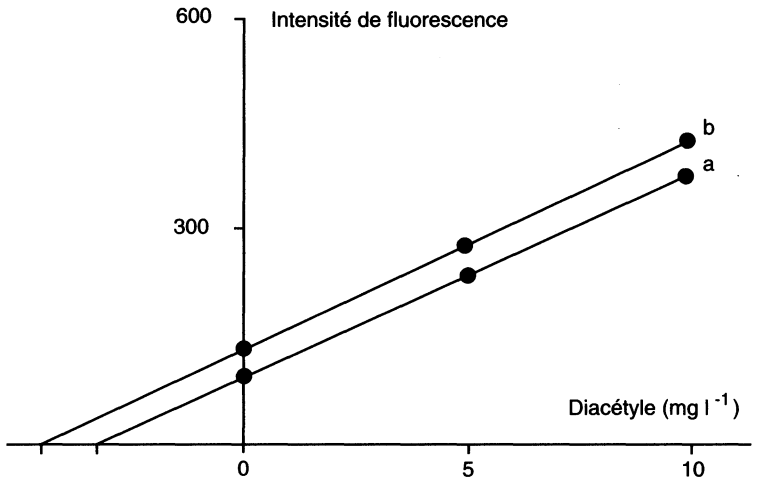


Fig. 1 — Détermination de la concentration de diacétyle et d'acétoïne d'un vin par la méthode des ajouts dosés.
a : détermination de la concentration du diacétyle
b : détermination de la concentration totale du diacétyle après oxydation de l'acétoïne

Remarques :

- Les mesures de fluorescence doivent être effectuées rapidement après la condensation avec le diamineanisol-3,4 ; après deux heures, des écarts dans les valeurs de fluorescence sont observés.

- La condensation du diacétyle avec le diamineanisol-3,4, doit s'opérer avec beaucoup d'attention ; le chauffage du ballon doit être régulier, sinon la reproductibilité des résultats n'est pas satisfaisante ; dans ce but, il est nécessaire d'enrober le col du ballon avec des feuilles d'aluminium.

- Pour faciliter l'ébullition, il est préférable d'ajouter des petites billes de verre au lieu de pierre ponce qui pourrait absorber une partie de la substance à doser.

RÉSULTATS

Le tableau I donne pour quelques vins les concentrations en diacétyle et en acétoïne mesurées avec la méthode fluorimétrique proposée et avec la méthode voltampérométrique. La comparaison des valeurs trouvées montre que les écarts entre les deux méthodes sont très faibles. Comme méthode de référence on a utilisé la méthode voltampérométrique car, comme il a été démontré (LECHNER et *al.*, 1981 ; RASPALEEV et *al.*, 1980), le dosage du diacétyle par cette méthode est sensible et précis.

TABLEAU I

Comparaison des concentrations de diacétyle et d'acétoïne déterminés par les méthodes fluorimétrique et voltampérométrique dans des vins secs grecs du commerce

Type de vin	Diacétyle (mg l^{-1})		Acétoïne (mg l^{-1})	
	Méthode		Méthode	
	fluorimétrique	voltampérométrique	fluorimétrique	voltampérométrique
Vin blanc	3,70 ± 0,06	3,68 ± 0,07	1,23 ± 0,04	1,26 ± 0,07
Vin blanc	4,20 ± 0,07	4,27 ± 0,08	9,01 ± 0,09	8,95 ± 0,09
Vin blanc	3,50 ± 0,05	3,53 ± 0,06	3,37 ± 0,07	3,32 ± 0,05
Vin blanc	3,90 ± 0,06	3,84 ± 0,07	2,75 ± 0,06	2,80 ± 0,04
Vin rouge	1,40 ± 0,04	1,32 ± 0,05	29,48 ± 0,13	29,33 ± 0,19
Vin rouge	5,40 ± 0,08	5,46 ± 0,07	9,58 ± 0,10	9,50 ± 0,11
Vin rosé	3,30 ± 0,05	3,40 ± 0,06	7,55 ± 0,08	7,50 ± 0,08
Vin rosé	4,30 ± 0,08	4,22 ± 0,06	17,03 ± 0,11	17,20 ± 0,12

Dans le tableau II sont rassemblées les teneurs en acétoïne et en diacétyle, mesurées avec la méthode fluorimétrique proposée, d'un échantillon de vin, après l'addition de quantités connues de ces deux composés. Les valeurs trouvées confirment d'une façon satisfaisante la précision de la méthode.

TABLEAU II

Récupération de diacétyle et d'acétoïne d'un vin blanc sec

Diacétyle (mg l^{-1})		Acétoïne (mg l^{-1})	
additionné	trouvé	additionné	trouvé
2,00	2,04	2,00	1,95
3,00	3,06	3,00	3,07
4,00	3,94	4,00	4,10
5,00	4,92	5,00	4,93
10,00	10,15	10,00	9,95

Dans le tableau III, on donne l'écart type relatif (RSD) de cinq mesures successives des concentrations du diacétyle et de l'acétoïne dans un échantillon d'un vin où on peut constater la bonne reproductibilité ainsi que la précision de la méthode.

TABLEAU III

Ecart type relatif de cinq mesures successives des concentrations de diacétyle et d'acétoïne d'un vin blanc sec

Numéro	Diacétyle (mg l^{-1})	Acétoïne (mg l^{-1})
1	3,91	2,70
2	3,95	2,71
3	3,83	2,70
4	3,96	2,80
5	3,85	2,84
RSD	1,49%	2,15%

CONCLUSION

La méthode ci-dessus, de la détermination de l'acétoïne en présence de diacétyle dans le vin est simple, sensible, fiable et spécifique. La condensation du diacétyle avec le diaminoanisol-3,4 est facile et quantitative.

Manuscrit reçu le 17 décembre 1993 ; accepté pour publication le 14 janvier 1994

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMERINE M.A., BERG H.W. et CRUESS W.V., 1967. *The technology of wine making.* AVI Publ. Co. Wesport, Connecticut.

AMERINE M.A. et OUGH C.S., 1974. *Wine and must analysis.* John Wiley and Sons, N.Y.

FORNACHON J.C.M. et LLOYD B., 1965. Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 710-716.

GUYMON J.F. et CROWELL E.A., 1965. The formation of acetoin and diacetyl during fermentation and the level found in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 85-91.

LECHNER E., KUNDER I. et KLOSTERMEYER H., 1981. Polarographic determination of biacetyl and acetoin in butter. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **173**, 372-375.

MAROULIS A.J., VOULGAROPOULOS A.N. et. HADJIANTONIOU-MAROULIS C.P., 1985. Fluorometric determination of biacetyl. *Talanta*, **32**, 504-506.

OUGH C.S. et AMERINE M.A., 1967. Studies with controlled fermentation temperature on some volatile compounds in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **18**, 157-164.

PASPALEEV E., KANCHEV K., DENCHEVA D. et BATZALOVA K., 1980. *Nahrung*, **24**, 303.RENOUIL Y., 1962. *Dictionnaire du Vin*. FÉRET ET FILS BORDEAUX.

PEYNAUD E., 1980. *Les arômes secondaires ou arômes de fermentation. Le goût du Vin*. DUNOD éd., Paris.

POSTEL W. et GÜVENC U., 1976. Gaschromatographische Bestimung von Diacetyl, Acetoin und 2,3-Pentandion in Wein. Z. Lebensm. *Unters.-Forsch.*, **161**, 35-44.

RADLER F., 1962. Die Bildung von Acetoin und Diacetyl durch die Bakterien des biologisches Säureabbaus. *Vitis*, **3**, 136-143.

RANKINE B.C., FORNACHON J.C.M. et BRIDSON D.A., 1969. Diacetyl in Australian dry red wines and its significance in wine quality. *Vitis*, **8**, 129-134.

REVEL G., BERTRAND A. et LONVAUD-FUNEL A., 1989. Synthèse des substances acétoiniques par *Leuconostoc Oenos*. Réduction du diacétyle. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, n°1, 39-45.

RIBÉREAU-GAYON J. et P., PEYNAUD E. et SUDRAUD P., 1972. *Sciences et Techniques du Vin*. Tome 1, DUNOD, Paris.

RIBÉREAU-GAYON J. et P., PEYNAUD E. et SUDRAUD P., 1975. *Sciences et Techniques du Vin*. Tome 2, DUNOD, Paris.

RONKAINEN P., BRUMMER S. et SOUMALAINEN H., 1970. A hydroxyketones acetoin and hydroxypentanones in wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **21**, 136-139.

SHINOHARA T., SHIMAZU Y. et WATANABE M., 1979. Content of acetoin and ethyl lactate in wines determined by gas chromatography and study of factors affecting their formation. *Agricultural and Biological Chemistry*, **43**, 2569-2577.

TYURIN S.T., AGEENA G.T., BLAGONRAVOVA I.N., OKOLELOV I.N. et ERAMOVA I.N., 1983. Contents of diacetyl and acetoin in wine under various conditions and storage periods. *Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR*, 1, 23-26.

VOULGAROPOULOS A. et SOULIS T., 1991. Fluorimetric determination of biacetyl in wines after condensation with 3,4-diaminoanisole. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **42**, 73-75.