Connaissance Vigne Vin 1976, **10**, N° 1, 51-71.

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE ET LES PROPRIETES DES COMPOSES PHENOLIQUES POLYMERISES DES VINS ROUGES

III. — Fractionnement des composés phénoliques avec la polyvinylpyrrolidone (p.v.p.)

Y. GLORIES

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

Travail effectué avec la collaboration technique de Monique AUGUSTIN

INTRODUCTION

Les composés phénoliques polymérisés du vin rouge sont constitués par des agrégats de molécules de flavanes appelés flavolanes dont la structure est très complexe. Le but de ces travaux est de préciser cette structure par des méthodes simples qui mettent en jeu des réactions caractéristiques et conduisent à des indices fonction de la condensation de ces molécules.

Les premières études sur ce sujet ont montré que les molécules de flavanes sont très réactives vis-à-vis de l'aldéhyde formique et très instables en milieu acide chlorhydrique concentré ; la précipitation de ces molécules est d'autant plus rapide qu'elles sont plus condensées (GLORIES, 1974). En outre, l'intervention de molécules d'anthocyanes dans la structure des composés phénoliques condensés a été mise en évidence par la saturation du vin en sels minéraux (GLORIES, 1974).

Au cours de ce nouveau travail, nous nous proposons d'étudier l'adsorption et la désorption sélective des composés phénoliques du vin rouge sur la p.v.p., appliquée plus particulièrement au fractionnement des flavolanes.

I. — ADSORPTION DES COMPOSES PHENOLIQUES.

La polyvinylpyrrolidone se présente sous la forme d'un polymère (fig. 1) possédant des sites électrophiles et nucléophiles capables de former des liaisons hydrogène avec de nombreux constituants et en particulier avec les phénols ; elle existe dans le commerce sous forme soluble et insoluble dans l'eau. En raison de ses propriétés, de nombreux auteurs ont utilisé cette résine pour séparer, fractionner ou éliminer les composés phénoliques du vin et de la bière.

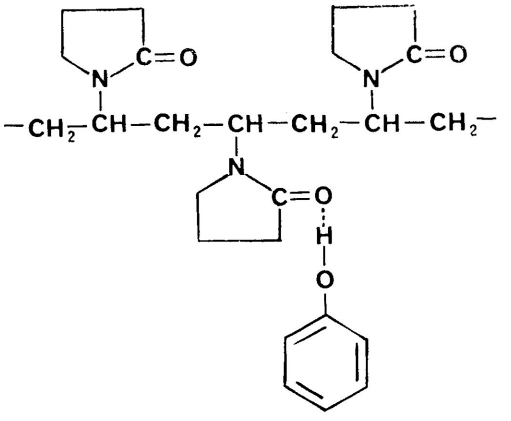


Fig. 1. — Hypothèse de liaison hydrogène entre la p.v.p. et les phénols (ANDERSEN et SOWERS, 1968).

La p.v.p. soluble a été utilisée par MITJAVILA et **al.** (1971) pour séparer la fraction polyphénolique astringente de l'ensemble des composés phénoliques du vin après précipitation du complexe par l'acide trichloracétique. Comme SINGLETON (1967), ces auteurs estiment que le mode de complexation p.v.p.-polyphénols est du même type que celui de la combinaison protéines-polyphénols.

En outre, les molécules d'anthocyanes peuvent être isolées et séparées de façon très satisfaisante à partir de vins ou de moûts par adsorption des composés phénoliques totaux sur la p.v.p. insoluble et désorption sélective des anthocyanes par les solvants hydroalcooliques ; les polymères restent fixés irréversiblement sur la résine (HRAZDINA, 1970, BOURZEIX et **al.**, 1973).

1) Mécanisme de l'adsorption.

Les composés phénoliques sont adsorbés avec des mécanismes différents sur la p.v.p. ; suivant leur structure et leur degré de condensation, plusieurs mécanismes ont été proposés :

EYMAN et DRAGO (1966), ANDERSEN et SOWERS (1968), démontrent que le mécanisme principal permettant aux substances d'être adsorbées sur p.v.p., est la formation de liaisons hydrogène entre un proton phénolique et l'oxygène du groupement carbonyle de la pyrrolidone (fig. 1).

En outre, DOUGHERTY et SCHEPARTZ (1969) proposent un autre mécanisme. La formation du pont hydrogène entraîne une augmentation du caractère électrophile du carbone du groupement carbonyle qui sera susceptible de produire des liaisons relativement énergiques avec un réactif nucléophile (fig. 2).

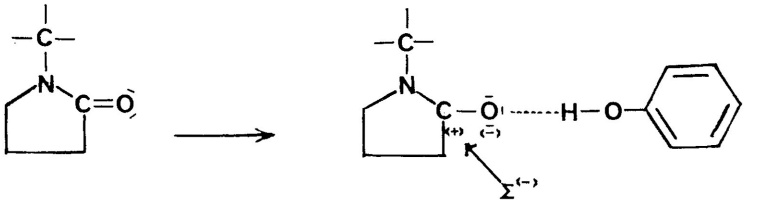


Fig. 2. — Hypothèse de réaction de la p.v.p. avec un groupement nucléophile.

Ces réactions dépendent étroitement du pH. A un pH acide et en particulier à celui du vin, les mécanismes décrits peuvent parfaitement intervenir (fig. 3).

Les différents composés phénoliques ne se comportent pas de la même manière, ils sont tous susceptibles de donner des liaisons hydrogène mais seules les flavanes et flavolanes sont capables d'être des réactifs nucléophiles à cause de leur forte densité électronique sur les carbones 6 et 8 (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Une seule limite à ce type de réaction est constituée par l'encombrement stérique des flavolanes.

Ceci expliquerait la différence d'adsorption entre les composés phénoliques et la difficulté d'élution des pigments polymérisés. HRAZDINA (1970) après avoir désorbé les anthocyanes, ne peut pas éluer ce qui reste sur la p.v.p. même en augmentant la concentration en éthanol de l'éluant jusqu'à 95 p. 100.

Une étude de la cinétique d'adsorption de l'acide tanique et des tanins du vin de muscat, a montré que la réaction était du 4^{e} ordre, donc très complexe (MENNETT et NAKAYAMA, 1970).

En fait le mécanisme de fixation de chaque composé phénolique doit faire intervenir un ensemble de réactions, les molécules fixées ayant plusieurs propriétés correspondant à des possibilités de liaisons dfférentes.

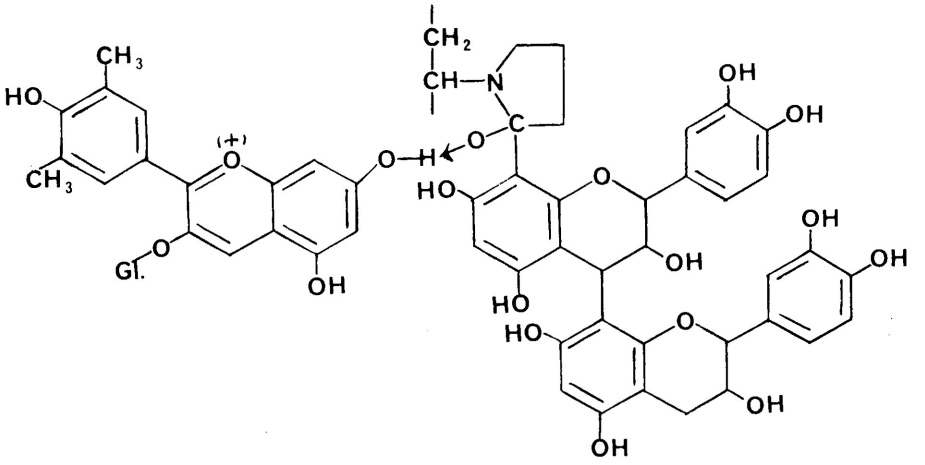


Fig. 3. — Hypothèse de réaction de la p.v.p. avec une molécule de malvidine monoglucoside et une procyanidine.

2) **Facteurs dont dépend l'adsorption.**

Une température basse favorise l'adsoption des molécules de tanins mais n'intervient pas sur la vitesse de réaction.

LOOMIS et BATTAILE (1966) recommandent un pH inférieur à 7 pour éviter l'ionisation des phénols incapables alors de former des liaisons hydrogène. ANDERSEN et SOWERS (1968) ont démontré que le pH de formation maximum des complexes p.v.p.-phénols, est de 3,5 dans le cas de **Nicotiana tabacum.** Les essais réalisés avec le vin à différents pH confirment ces résultats.

La formation de liaisons hydrogène est favorisée par un milieu aqueux, mais la présence d'alcool n'est pas incompatible si la proportion ne dépasse pas 10 p. 100 (ANDERSEN et SOWERS, 1968).

3) **Traitement préalable de la p.v.p.**

La mise en œuvre de la polyvinylpyrrolidone a été faite à l'Institut d'Œnologie en collaboration avec A. LEFEBVRE. La p.v.p. insoluble du commerce ou Polyclar AT, est riche en ions métalliques et possède une granulométrie assez hétérogène. Ce produit doit donc être purifié avant utilisation.

La méthode que nous avons utilisée consiste à faire gonfler la p.v.p. dans de l'eau, puis on effectue deux ou trois décantations du liquide surnageant pour éliminer les fines particules qui risquent de diminuer le débit. La purification proprement dite se fait par ébullition de la résine dans HCl (12 N) pendant 30 minutes. Un abondant lavage à l'eau permet d'obtenir la résine prête à l'emploi. Cette technique est inspirée de celles proposées par LOOMIS et BATTAILE (1966) et ANDERSEN et SOWERS (1968).

4) **Mode d'utilisation.**

La p.v.p. peut être utilisée au laboratoire :

— soit par agitation avec le vin ou avec des solutions de composés phénoliques (SINGLETON, 1967 et ANDERSEN et SOWERS, 1968) ;

— soit par percolation dans une colonne de verre.

Dans ce dernier cas, la fixation des composés phénoliques du vin est totale dans la mesure où la quantité de résine est suffisante pour le volume de vin à analyser (de 1 à 1,5 ml de p.v.p. par ml de vin suivant sa richesse en composés phénoliques et en alcool).

Nous envisageons ici exclusivement l'utilisation de la p.v.p. sur le plan analytique. On sait que cette résine peut également être dispersée dans le vin à des doses beaucoup plus faibles pour diminuer l'astringence de vins très taniques (technique non autorisée en France).

II. — DESORPTION DES COMPOSES PHENOLIQUES SIMPLES (CPS) AVEC LES SOLVANTS HYDROALCOOLIQUES.

1) **Rôle de l'eau.**

Après fixation des composés phénoliques sur p.v.p., le passage de l'eau à travers la colonne permet de laver les composés phénoliques adsorbés et par conséquent d'entraîner tout ce qui n'est pas fixé c'est-à-dire les sels, les sucres, les acides et les alcools. Cette méthode constitue donc un bon procédé de défécation ;au cours de ce lavage, aucune molécule colorée n'est en principe éluée par l'eau.

2) **Rôle des solvants hydroalcooliques.**

LOOMIS et BATTAILE (1966) et ANDERSEN et SOWERS (1968) ont classé les solvants d'élution en fonction de leur capacité à dissocier les

liaisons hydrogène ; dans le cas du vin nous nous sommes inspirés de ceux utilisés par HRAZDINA (1970) et BOURZEIX et **al.** (1973). Quatre solvants hydroalcooliques ont été essayés afin de voir celui qui permettrait la désorption la plus importante et par conséquent la plus complète :

Solvant I : Ethanol — H_2O — HCl (1 N) (70-30-1)
Solvant II : Ethanol — Méthanol — HCl (12 N) (66-33-0,1)
Solvant III : Méthanol — H_2O — HCl (1 N) (70-30-1)
Solvant IV : Méthanol — HCl (12 N) (99,9-0,1)

TABLEAU I

Anthocyanes désorbées par les solvants hydroalcooliques et caractéristiques spectrales des fractions

(Vin de 1973, 148 mg d'anthocyanes par litre)

ar anneau rouge
zr zone rosée

		Anthocyanes (SO_2)		Longueur d'onde maximum
		(mg/l)	Pourcentage total désorbé	Me(OH) 0,1 p. 100 HCl
Solvant I	zr	29	63	520
	ar	64		535
Solvant II	ar	64	67	535
	zr	35		520
Solvant III	zr	28	62	515
	ar	64		535
Solvant IV	ar	64	63	535
	zr	30		515

Au point de vue séparation chromatographique les quatre solvants donnent à peu près les mêmes résultats (tableau I), mais la vitesse de désorption des composés phénoliques varie en fonction de la teneur en eau des solvants ; elle est d'autant plus rapide que la teneur est plus

faible. Ils enlèvent tous un anneau très rouge (ar), suivi ou précédé suivant les cas, d'une zone rosée (zr) assez diffuse. Après élution, le haut de la colonne reste coloré en marron-brun par les composés phénoliques polymérisés qui sont fortement fixés sur la p.v.p.

Les dosages sur les fractions ramenées au volume de départ montrent que dans le meilleur des cas, 67 p. 100 des anthocyanes sont désorbés par ces différents solvants (tableau I). La répartition entre (zr) et (ar) est pratiquement constante.

Ces résultats sont confirmés par ceux du tableau II qui mettent en évidence la rétention presque totale des tanins (95 p. 100), lors de l'élution par un solvant hydroalcoolique.

TABLEAU II

Désorption des composés phénoliques d'un vin de 1973 par le solvant I

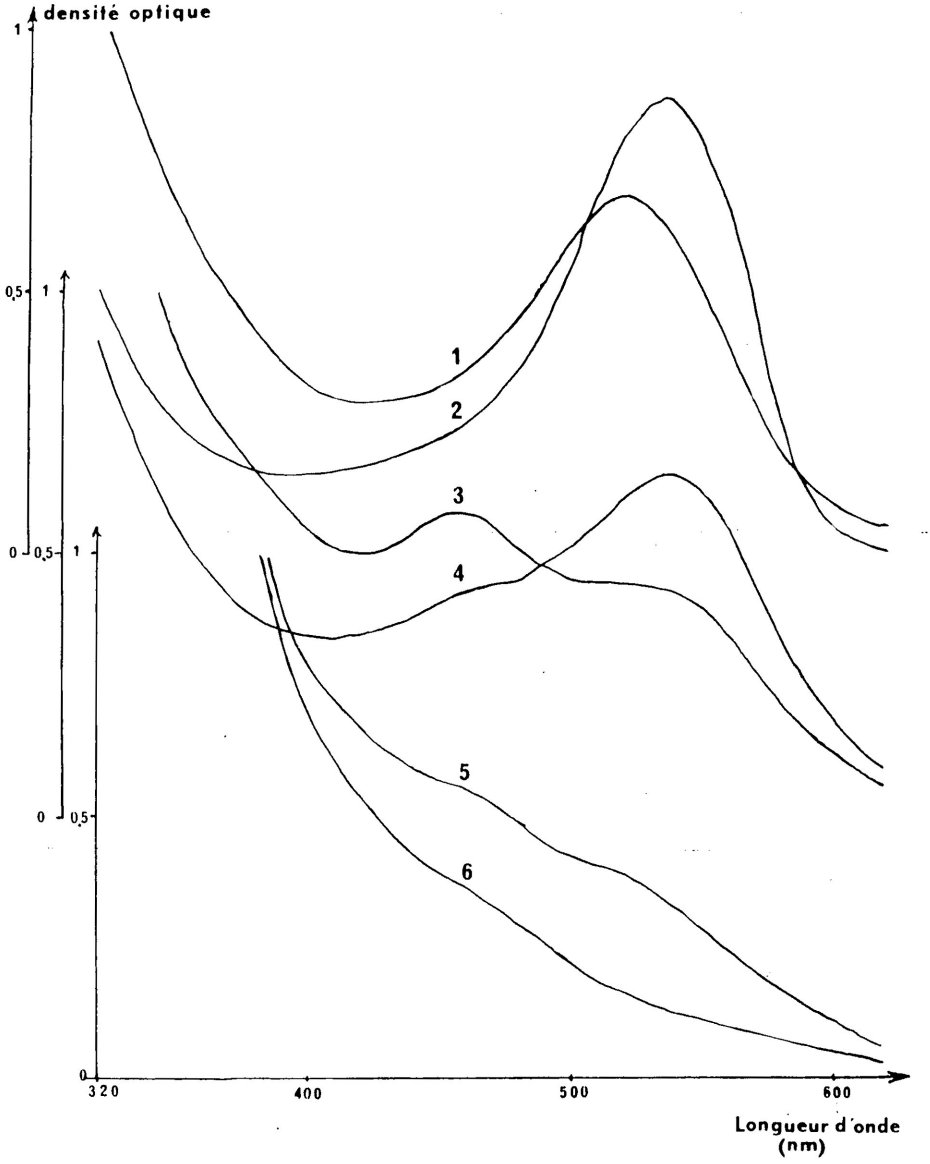
	Phénols totaux (d 280)		Anthocyanes (SO_2)		Tanins	
	Indice	Pourcentage désorbé	mg/l	Pourcentage désorbé	g/l	Pourcentage désorbé
Témoin	55		350		2,15	
Elution par I	11	20	232	66	0,12	5

3) **Identification des fractions.**

La chromatographie sur papier et l'étude du spectre dans le méthanol à 0, 1 p. 100 HCl précisent la pureté des anthocyanes ainsi isolées.

L'anneau (ar) est constitué par un mélange de monoglucosides de malvidine, paeonidine, d'un peu de pétunidine et de quelques anthocyanes acylées. En chromatographie sur papier la séparation est très nette, exempte de traînée, le résidu sur la ligne de départ est presque inexistant.

La chromatographie sur papier et la révélation à la vanilline chlorhydrique, des élutions antérieures et postérieures à l'anneau (zr) mettent en évidence en plus des anthocyanes, la présence de catéchine et de traces de procyanidines, ce qui explique les résultats du tableau II concernant les phénols totaux.



(1) Zone rouge du vin jeune, éluée par le solvant I (zr)
(2) Anneau rouge du vin jeune, élué par le solvant I (ar)
(3) Fraction jaune du vin jeune, éluée par l'acide formique
(4) Fraction rouge du vin jeune, éluée par l'acide formique
(5) Fraction rouge du vin jeune, éluée par l'acide formique, oxydée par l'air
(6) Fraction jaune du vin vieux, éluée par l'acide formique

Fig. 4. — Spectre des différentes fractions d'un vin jeune et d'un vin vieux dans le méthanol-HCl (0,1 p. 100)

Le spectre de la fraction correspondant à l'anneau (ar) est parfaitement superposable à celui du mélange d'anthocyanes pures tandis que celui des autres fractions a un maximum plus aplati et décalé de 15 à 20 nanomètres vers les courtes longueurs d'ondes (tableau I et fig. 4). Ces résultats sont confirmés par la couleur des éluats en fonction du pH et après addition d'un excès de SO_2. Seules les élutions correspondantes à l'anneau sont bleu franc en milieu alcalin et sont décolorées totalement par le SO_2 ; les autres solutions sont bleu-vert après addition de soude et jaunes en présence de SO_2.

III. — DESORPTION DES COMPOSES PHENOLIQUES CONDENSES (CPC) RESTANT FIXES SUR LA COLONNE.

1) Méthode.

L'acide formique concentré (LEFEVBRE, communication personnelle) est le solvant qui nous a donné les meilleurs résultats pour désorber le plus de formes condensées, restant fixées après élimination des anthocyanes. Cet acide a un pouvoir d'élution très important tout en étant bien moins réactif que la majorité des acides minéraux. De plus il est volatil ce qui permet de l'éliminer facilement par évaporation.

Une étude a été réalisée avec une procyanidine de masse moléculaire 529 ± 35, fixée sur p.v.p. puis désorbée avec l'acide formique, le solvant a été évaporé trois heures après ; aucun changement de structure n'a été observé, la masse moléculaire après évaporation était de 556 ± 40 et les deux chromatogrammes parfaitement identiques. Cependant il est quand même recommandé d'évaporer l'acide formique le plus rapidement possible après l'élution.

D'autres essais avec des solvants alcalins et acides ne nous ont pas permis une aussi bonne séparation et ont provoqué des variations de structure importantes.

L'élution de la p.v.p. par l'acide formique libère un nouvel anneau dont le front est très rouge et la fin orangée ; son importance varie avec le type de vin étudié. Cette bande est suivie d'une zone jaune qui n'est désorbée que très lentement.

Une fois cette élution terminée et suivant l'état de condensation des composés phénoliques du vin, la colonne peut être blanche ou colorée. Elle est bien lavée dans le cas des vins jeunes, mais reste colorée en

jaune-marron pour les vins vieux et certains vins de presse très chargés. Comme nous le verrons, cette fraction qui reste fortement adsorbée correspond à des composés phénoliques très polymérisés (tableau III).

TABLEAU III

Etude de la reproductibilité du fractionnement des composés phénoliques de deux vins sur p.v.p.

(1) 1ère séparation — (2) 2ème séparation

	Phénols totaux (d 280)			Anthocyanes (SO_2)			Tanins		
	Indice		Pourcentage moyen de récupération	mg/l		Pourcentage moyen de récupération	g/l		Pourcentage moyen de récupération
	(1)	(2)		(1)	(2)		(1)	(2)	
Vin témoin (1973)	55			350			2,15		
Elution avec le solvant hydroalcoolique (1)	16	16	29	242	250	70	0,12	0,05	4
Elution avec HCOOH									
rouge	31	32	58	70	77	20	0,87	0,92	41
jaune	11	11	20	10	5	2	1,0	1,0	46
Total			107			92			91
Vin témoin (1966)	54			85			3,30		
Elution avec le solvant hydroalcoolique (1)	9	10	17	12	10	13	0,24	0,24	7
Elution avec HCOOH									
rouge	24	25	45	42	45	51	1,60	1,60	48
jaune	6	6	11	6	6	7	0,65	0,65	14
Total			73			71			69

Un rinçage à l'eau de la p.v.p. est nécessaire après passage des solvants hydroalcooliques et avant élution par l'acide formique, sinon les phénomènes de rétention sont amplifiés surtout dans le cas de solvants alcooliques purs (solvants II et IV). En effet, l'alcool contracte la p.v.p. alors que l'acide formique la dilate (la dilatation est moins régulière sur un réseau trop contracté).

La reproductibilité de la méthode est bonne (tableau III) surtout pour les vins jeunes ; même si les dimensions de la colonne ne sont pas identiques dans chaque cas, la quantité minimum de p.v.p. à utiliser est un des facteurs les plus importants à respecter.

Cette méthode permet donc de séparer les composés phénoliques condensés en deux fractions que l'on peut isoler (rouge et jaune) et un résidu impossible à extraire de la résine.

2) **Discussion des résultats.**

Les résultats du tableau III permettent de mettre en évidence certains faits concernant la couleur du vin rouge et sa composition en composés phénoliques :

a) La couleur du vin rouge jeune est surtout dûe aux anthocyanes libres (éluées par les solvants hydroalcooliques), tandis que les fractions rouges et jaunes (éluées par l'acide formique) sont relativement plus importantes dans le cas du vin vieux.

b) Les quantités globales d'anthocyanes dosées sur les fractions éluées par l'acide formique sont du même ordre de grandeur pour le vin vieux et le vin jeune, elles ne dépassent pas 100 mg par litre ; mais compte tenu de la diminution des anthocyanes totales au cours du vieillissement, cette fraction est proportionnellement plus importante dans les vins vieux. Tout se passe comme si les anthocyanes libres disparaissaient au cours du vieillissement et que seules restaient dans le vin vieux les anthocyanes qui sont déjà combinées aux tanins dans le vin jeune.

c) Parmi les tanins d'un vin, la proportion correspondante à la fraction jaune est plus importante dans le vin jeune que dans le vin vieux (tableau III). Au cours du vieillissement ces molécules se condensent et sont adsorbées irréversiblement sur la résine.

d) Les tanins du vin vieux, plus condensés que ceux du vin jeune, sont fixés plus fortement sur la p.v.p. ; en effet après passage de l'acide formique, il en reste encore 31 p. 100 qui sont adsorbés irréversiblement (9 p. 100 dans le cas du vin jeune).

e) L'élution avec l'acide formique des colonnes préalablement lavées avec les solvants hydroalcooliques précédemment étudiés nous a permis de faire une comparaison du poids de tanins désorbés dans les quatre

conditions du tableau IV. On voit que la nature de l'alcool servant à éluer les anthocyanes intervient dans la capacité de désorption de l'acide formique ; la contraction provoquée par le méthanol (solvants III et IV) paraît plus importante que celle due à l'éthanol (solvants I et II). Donc le solvant I proposé par HRAZDINA (1970) paraît le plus adapté à la désorption des anthocyanes et par la suite à celle des tanins.

TABLEAU IV

Poids de tanins désorbés de la p.v.p. par l'acide formique après passage des solvants hydroalcooliques (I) (II) (III) (IV)

(les résultats sont exprimés en mg pour 10 ml de vin de 1973)

	Elution avec HCOOH		Total
	Fraction rouge	Fraction jaune	
p.v.p. éluée avec le solvant (I)	7,74	6,33	14,07
p.v.p. éluée avec le solvant (II)	7,55	5,88	13,43
p.v.p. éluée avec le solvant (III)	7,48	5,37	12,85
p.v.p. éluée avec le solvant (IV)	6,25	5,91	12,16

IV. — **IDENTIFICATION ET PROPRIETES DES DEUX FRACTIONS DESORBEES PAR L'ACIDE FORMIQUE** (CPC).

1) **Pureté de la fraction rouge.**

Afin de voir si la fraction rouge précédemment éluée par l'acide formique correspondait à un ensemble de composés bien définis, nous avons réalisé une nouvelle séparation de cette fraction sur p.v.p., dans les mêmes conditions que pour le vin. Les résultats sont rassemblés dans le tableau V.

La presque totalité des phénols (70 à 90 p. 100) dont cette fraction est constituée, est libérée par l'acide formique. Au cours de cette opération il y a formation d'une nouvelle fraction jaune peu importante qui correspond certainement à une mauvaise séparation lors du premier fractionnement du vin. Le solvant I libère également un peu de composés phénoliques, mais ces valeurs sont très faibles, à la limite de la sensibilité des méthodes de dosage.

On a donc affaire à une fraction bien définie constituée de molécules de tanins et d'anthocyanes combinées entre elles puisque inséparables sur p.v.p.

TABLEAU V

Nouvelle séparation sur p.v.p. de la fraction rouge, du vin de 1973, éluée par l'acide formique

	Phénols totaux (d 280)		Anthocyanes (SO_2)		Tanins	
	Indice	Pourcentage de récupération	mg/l	Pourcentage de récupération	g/l	Pourcentage de récupération
Fraction rouge du vin de 1973 (tabeau III)	31		70		0,87	
Elution avec le solvant hydroalcoolique (1)	4	13	6	9	0,03	4
Elution avec HCOOH						
rouge	23	74	60	86	0,71	82
jaune	3	10	0	0	0,11	13
Total		97		95		99

2) **Solubilité et couleur des deux fractions.**

Les deux fractions (rouge et jaune) sont très peu solubles dans l'eau contrairement aux anthocyanes non polymérisées ; leur solubilité dans le méthanol est bonne, surtout en milieu acide (HCl à 0,1 p. 100).

SO_2 ne décolore pas totalement la fraction rouge qui reste jaune rosé. La résistance à la décoloration par le SO_2 des combinaisons tanins-anthocyanes est conforme aux observations de SOMERS (1966), ainsi que les variations de la couleur des deux fractions en fonction du pH (tableau VI).

3) **Chromatographie des deux fractions.**

La chromatographie des deux fractions sur couche mince de cellulose et sur papier dans la phase supérieure du mélange butanol-acide acétique-eau (4 - 1 - 5) ne permet pas de mettre en évidence de molécules d'anthocyanes libres comme dans le cas de la fraction rouge éluée par les solvants hydroalcooliques. Il n'y a que des traînées rouges et jaunes avec deux spots de Rf très inférieur à celui de la malvidine monoglucoside. Le chromatogramme montre cependant que ces fractions renferment des composés phénoliques qui ne migrent pas.

TABLEAU VI

Couleurs des fractions éluées par l'acide formique en fonction du pH

	pH très acide	pH du vin	pH 7	pH alcalin	pH très alcalin
Fraction rouge	rouge	rouge orangé	jaune	bleu-gris	jaune-gris
Fraction jaune	orange	jaune	jaune	jaune-vert	marron

Une chromatographie de ces deux fractions avec le même support mais dans le mélange HCl-acide acétique-H_2O (5 - 40 - 80) (JURD et SOMERS, 1970) montre une traînée à l'emplacement du tétrahydroxyxanthylium mais ne permet pas de conclure à sa présence certaine.

La chromatographie dans le solvant Forestal, après hydrolyse acide de la fraction rouge (HCl 1 N, 10 minutes à 100 °C), et extraction par l'alcool isoamylique permet d'identifier les anthocyanes combinées aux tanins. Nous trouvons pour tous les vins jeunes étudiés les cinq anthocyanidines du raisin ; la delphinidine et la petunidine étant en quantités aussi importantes que la malvidine.

Le problème est de savoir si dans cette combinaison anthocyanes-tanins qui constitue la fraction rouge, l'anthocyane réagit avec les tanins sous forme d'hétéroside ou sous forme d'aglycone. L'hydrolyse acide suivie de chromatographie dans la phase supérieure du mélange butanol-acide acétique-eau, a permis dans certains cas l'identification de traces de glucose. Ce fait n'a pas été démontré pour toutes les fractions rouges étudiées, la quantité de sucre libéré étant alors très faible et difficilement décelable.

L'hydrolyse acide des fractions jaunes ne libère que de la cyanidine provenant très certainement de la transformation des tanins.

4) **Etude des spectres des deux fractions.**

Le spectre dans le méthanol à 0,1 p. 100 d'HCl, de la fraction rouge éluée par l'acide formique, possède un maximum à 540 nanomètres et un petit épaulement à 460 nanomètres, celui de la fraction jaune a son maximum à 460 nanomètres et un épaulement à 530 nanomètres (fig. 4).

Si l'on compare le spectre de cette fraction à celui de la fraction (I ar) (fig. 4) éluée par le solvant I, nous constatons que le maximum est légèrement décalé et plus aplati, ce qui confirme la forme flavylium d'une partie au moins des anthocyanes combinées aux tanins.

Au bout de quelques jours de conservation à l'air de la fraction rouge dans le méthanol à 0,1 p. 100 HCl, la couleur rouge des anthocyanes disparaît, la solution devient orange puis jaune. Le spectre (fig. 4) se rapproche de celui de la fraction jaune mais ne présente aucun maximum défini ; il est presque identique à celui de la fraction jaune du vin vieux. L'instabilité de ces substances en milieu alcoolique est un fait nouveau, cependant cette réaction se fait en présence d'oxygène et paraît difficilement réalisable pendant le vieillissement du vin en bouteille.

TABLEAU VII

Masse moléculaire moyenne des fractions éluées par l'acide formique, de vins d'âges différents

(la fraction du vin de 1952 est orangée)

	Fraction rouge	Fraction jaune
Vin de 1974	1100	1200
Vin de 1973 (a)	1259	1321
Vin de 1973 (b)	1252	1235
Vin de 1966	1496	1369
Vin de 1952	1820	—

5) **Masse moléculaire moyenne de ces fractions.**

La détermination de la masse moléculaire moyenne de ces fractions par microcryométrie (GLORIES, 1971) donne un ordre de grandeur de la condensation. Elle est comprise (tableau VII) entre 1.000 et 2.000 ; les

valeurs les plus élevées correspondent aux vins les plus âgés. Ce sont des groupements moléculaires relativement faibles par rapport aux tanins condensés adsorbés irréversiblement sur la colonne.

Les deux fractions rouge et jaune du vin jeune possèdent à peu près la même masse moléculaire moyenne. Ce résultat confirme celui de la chromatographie.

Au cours du vieillissement il y a augmentation de la masse moléculaire de la fraction rouge qui change de couleur et devient orange dans le cas des vins très vieux.

V. — DESORPTION DE SOLUTIONS MODELES DE COMPOSES PHENOLIQUES.

Nous avons réalisé des solutions modèles à partir de dimères leucoanthocyaniques extraits de l'écorce de pin maritime (MASQUELIER) et d'anthocyanes extraites de pellicules de Cabernet-Sauvignon (LEFEBVRE) ; ces solutions sont à pH 3,2 et contiennent 10 ° d'alcool et 5 g d'acide tartrique par litre.

Le mélange tanins-anthocyanes fraîchement préparé est divisé en deux parties. Une partie est fractionnée sur p.v.p. selon la technique précédente et l'autre est gardée dans les fioles en vidange pendant deux mois. Le vieillissement de ces solutions en milieu oxydant produit une polymérisation des molécules (RIBÉREAU-GAYON, 1973), une évolution de la couleur vers l'orangé et par conséquent une précipitation des grosses molécules. Le même fractionnement a été réalisé après centrifugation sur la solution vieillie.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau VIII :

a) Les tanins utilisés sont en majorité des dimères et sont en partie désorbés par les solvants hydroalcooliques, le reste est libéré par l'acide formique.

b) Avant oxydation la presque totalité des anthocyanes est désorbée par le solvant I (86 p. 100), il reste juste un faible résidu (15 p. 100), libéré par l'acide formique.

Après oxydation il y a beaucoup moins d'anthocyanes libres ; la quantité combinée aux tanins est constante. Cette combinaison est

TABLEAU VIII

Fractionnement sur p.v.p. des composés phénoliques en solution modèle

(1) solution fraîche de tanins + anthocyanes
(2) solution vieillie de tanins + anthocyanes

	Phénols totaux (d 280)				Anthocyanes				Tanins			
	(1)		(2)		(1)		(2)		(1)		(2)	
	Indice	Pourcentage de récupération	Indice	Pourcentage de récupération	mg/l	Pourcentage de récupération	mg/l	Pourcentage de récupération	g/l	Pourcentage de récupération	g/l	Pourcentage de récupération
Solution témoin	37				246		88		2,35		2,50	
Lavage avec le solvant I	18	46	13	34	211	86	20	22	0,89	38	0,50	20
Lavage avec HCOOH												
rouge	9	24	15	39	37	15	35	40	0,10	4	0,75	30
jaune	9	24	9	23	0	0	15	17	1,29	55	0,95	38
TOTAL		94		96		101		79		97		85

confirmée par l'augmentation de la quantité de tanins de la fraction rouge par rapport au mélange fraîchement préparé.

c) L'analyse de ces solutions met également en évidence la condensation des molécules de tanins ; 15 p. 100 des tanins sont encore adsorbés sur p.v.p. après passage de l'acide formique après oxydation. alors que seulement 3 p. 100 l'étaient avant.

Cette expérience démontre de façon certaine la combinaison en solution modèle des anthocyanes et des tanins par oxydation de l'air ; ce phénomène contribue très certainement à la disparition des anthocyanes du vin au cours du vieillissement.

VI. — **APPLICATIONS.**

La méthode que nous avons adoptée dans le cas du vin est la suivante : 10 ml de vin sont adsorbés par 15 ml de p.v.p. traitée comme précédemment et contenue dans une colonne de verre.

La résine est alors rincée par différents solvants dans l'ordre suivant : a) eau distillée (100 ml) ; b) solvant I jusqu'à ce que l'éluat soit incolore (environ 100 ml) ; c) eau distillée (50 ml) ; d) acide formique jusqu'à ce que l'éluat soit incolore (environ 50 ml).

Après évaporation rapide, surtout dans le cas de l'acide formique, les éluats sont ramenés au volume de départ (10 ml) et les phénols totaux, les tanins et les anthocyanes sont dosés dans ces solutions. La différence entre les résultats du vin et ceux correspondant à la somme des éluats représente la quantité de composés phénoliques les plus condensés encore adsorbés sur la résine (tableaux III, V et VIII).

Nous avons signalé que les solutions hydroalcooliques libèrent les anthocyanes libres du vin et l'acide formique élue ensuite les anthocyanes combinées aux tanins. La connaissance des proportions respectives de ces deux formes constitue un indice caractérisant le vieillissement, les conditions de vinification et par conséquent la couleur du vin.

Le rapport $\frac{\text{Anthocyanes libres}}{\text{Anthocyanes combinées}}$ est d'autant plus faible que le vin est plus vieux (tableau IX).

Pour les vins jeunes, le pourcentage d'anthocyanes combinées n'est pas directement fonction de leur concentration en tanins. Pour ces vins, le rapport dépend surtout des conditions de vinification et des cépages (tableau IX), Le vin de presse est beaucoup plus riche en anthocyanes combinées que le vin de goutte ; le vin issu du cépage Cabernet possède plus d'anthocyanes libres que celui issu du cépage Merlot après un an de conservation (les conditions de vinification étant identiques).

TABLEAU IX

Anthocyanes libres et combinées de différents vins

(Analyses effectuées au cours de l'année 1975)

	Tanins g/l	Anthocyanes mg/l	Pourcentage Anthocyanes libres (1)	Pourcentage Anthocyanes combinées (2)	Rapport (1)/(2)
1974 Vinification avec rafles	2,6	205	76	20	3,8
1974 Vinification sans rafles	1,3	165	64	33	1,9
1974 Vin de goutte	1,2	150	79	16	4,9
1974 Vin de presse	4,1	320	58	38	1,5
1973 Merlot	1,32	160	58	37	1,6
1973 Cabernet	2,08	275	71	24	2,9
1973 Médoc	2,15	350	70	22	3,2
1966 Médoc	3,30	85	12	42	0,3

CONCLUSION

Les principaux résultats qui découlent de ce travail sont les suivants :

1°) La p.v.p. peut fixer la totalité des composés phénoliques du vin rouge. La rétention sur la résine par adsorption est un fait admis et démontré. Nous avons suggéré un mode de réaction avec les flavolanes permettant d'expliquer dans certains cas, leur fixation irréversible, alors que d'autres composés phénoliques sont susceptibles d'être élués.

2°) Les sucres, les acides, les sels et les alcools sont récupérés par lavage à l'eau ; cet adsorbant peut donc être utilisé pour la défécation du vin.

3°) Les solvants hydroalcooliques, et l'acide formique, désorbent successivement les anthocyanes libres, les anthocyanes combinées aux tanins et des tanins par élution de la colonne de p.v.p. La masse moléculaire moyenne des deux dernières fractions est comprise entre 1.000 et 2.000. Les tanins très condensés sont adsorbés irréversiblement sur la résine.

Le dosage de ces différentes fractions permet d'obtenir la composition du vin en composés phénoliques et donne leur répartition en fonction de leur structure.

4°) Une étude détaillée des composés libérés par l'acide formique (CPC) montre que la fraction rouge est dans le cas du vin jeune une combinaison entre les tanins et les anthocyanes. Ces composés proviennent en majorité du matériel végétal, leur formation dans le vin ne s'effectue que lentement au détriment des tanins peu condensés et en faisant intervenir les anthocyanes dihydroxylées peu stables.

5°) Le rapport entre les anthocyanes libres et combinées est une indication de l'âge du vin et des conditions de vinification.

Manuscrit reçu le 14 novembre 1975.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSEN R.A. et SOWERS J.A., 1968. Optimum conditions for bonding of plant phenols to insoluble polyvinyl-pyrrolidone. **Phytochemistry, 7,** 293-301.

BOURZEIX M., HEREDIA N. et NATCHKOV D., 1973. Isolement quantitatif du monoglucoside du malvidol du vin rouge ou d'extraits méthanoliques et marcs de raisins. **J. Chrom., 87,** 269-270.

DOUGHERTY T.M. et SCHEPARTZ A.I., 1969. Effect of pH on elution of bases and a proposed mechanism for the adsorption of purines. **J. Chrom., 43,** 397-399.

EYMAN D.P. et DRAGO R.S., 1966. Nuclear magnetic resonance studies of hydrogen bonding. **J. Am. Chem. Soc., 88,** 1617-1620.

GLORIES Y., 1971. Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. **Thèse doctorat 3e cycle,** 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. 1,** 57-79.

GLORIES Y., 1974. II. — Précipitation et extraction en présence de sels minéraux. Action des protéines. **Conn. Vigne Vin, 4,** 375-393.

HRAZDINA G., 1970. Column chromatographic isolation of the Anthocyanidin 3-5 diglucosides from grapes. **J. Agr. Food. Chem., 18,** 243-245.

JURD L. et SOMERS T.C., 1970. The formation of Xanthylium salts from proanthocyanidines. **Phytochemistry, 9,** 419-427.

LEFEBVRE A., 1973. Communication personnelle.

LOOMIS W.D. et BATTAILE J., 1966. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. **Phytochemistry, 5,** 423-428.

MENNETT R.H. et NAKAYAMA T.O.M., 1970. Température dependence of tanin adsorption by Poly-N-Vinyl pyrrolidone. **Am. J. Enol. Vitic.,** 162-167.

MITJAVILA S., SCHIAVON M. et DERACHE R., 1971. Teneur en tanins des boissons. Séparation et dosage colorimétrique de la fraction polyphénolique astringente. **Ann. Techn. Agric., 20** (4), 335-346.

RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges. **Vitis, 12,** 119-142.

SINGLETON V.L., 1967. Adsorption of natural phenols from beer and wine, Techn. quarterly of the Master Brewer's Assoc. of America, 4, 245-253.

SOMERS T.C., 1966. Wine tanins-isolation of condensed flavonoid pigments by gel-filtration. **Nature, 209,** 368-370.

SOMERS T.C., 1971. The polymeric nature of wine pigments. **Phytochem., 10.** 2175-2186.