Connaissance Vigne Vin, 1984, **18,** N° 3, 195-217

LA COULEUR DES VINS ROUGES

Ire Partie LES EQUILIBRES DES ANTHOCYANES ET DES TANINS

Y. GLORIES

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

INTRODUCTION

La couleur du vin, définie par l'intensité colorante (SUDRAUD, 1958), correspondant à la somme des composantes rouge et jaune, ne présente que peu de relation avec les concentrations en anthocyanes et en tanins déterminées par les méthodes chimiques (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1965, 1966). Le pH du milieu et sa teneur en anhydride sulfureux qui interviennent beaucoup sur la couleur des anthocyanes ne sont pas les seuls facteurs responsables des différentes nuances que présente le vin rouge. Les tanins en se combinant avec les anthocyanes (SOMERS, 1971), conduisent à des copolymères qui possèdent des propriétés et des couleurs différentes de celles des anthocyanes libres.

La connaissance de la teneur en molécules combinées dans le vin (indice de pvp, GLORIES, 1978) constitue une amélioration, mais ne permet pas toujours l'interprétation concrète de son origine ; la nature, la structure et les propriétés des combinaisons entre les tanins et les anthocyanes sont différentes en fonction de la structure des tanins qui réagissent et en fonction des conditions de la réaction.

Compte tenu des données théoriques récentes concernant l'équilibre de la malvidine mono et diglucoside en solution aqueuse (BROUILLARD et DELAPORTE, 1978) et une meilleure connaissance de la composition en composés phénoliques du vin rouge (GLORIES, 1978), nous présentons dans une première partie, les équilibres des anthocyanes susceptibles d'intervenir dans le vin au cours de son élaboration et pendant sa conservation. Dans une deuxième partie, nous discuterons les résultats d'une part, des méthodes de dosage des composés phénoliques et d'autre part, des indices concernant la couleur, nous proposerons également une méthode pour l'étude de la couleur du vin rouge.

THEORIE DES EQUILIBRES EN FONCTION DU pH

Les anthocyanes sont les pigments rouges du raisin et du vin qui possèdent en commun le même squelette de type phényl-2-benzopyrilium.

elles se différencient suivant la nature de la substitution du noyau latéral, le nombre de glucoses estérifiés, le taux d'acylation des glucoses et la nature des acides estérifiés. En milieu acide, la présence de ces substituants, entraîne des modifications de répartition des électrons π dans les cycles et par conséquent de la conjugaison. En solution aqueuse, les longueurs d'onde d'absorption maximum se répartissent de part et d'autre de 520 nm ; le spectre du mélange correspondant à l'enveloppe, est plus ou moins déplacé suivant l'importance des différents constituants.

Dans une étude récente et en faisant intervenir la relaxation chimique BROUILLARD et DUBOIS (1977), BROUILLARD et DELAPORTE (1977), BROUILLARD et *al.* (1978), ont montré que les anthocyanes sont présentes dans les milieux acides sous quatre formes en équilibre : le cation flavylium (A+) de couleur rouge ; la base anhydride ou base quinonique (A0) de couleur mauve ; la pseudobase ou base carbinol (A0H) incolore et la chalcone (C) incolore ou légèrement jaune absorbant vers 350 nm (figure 1).

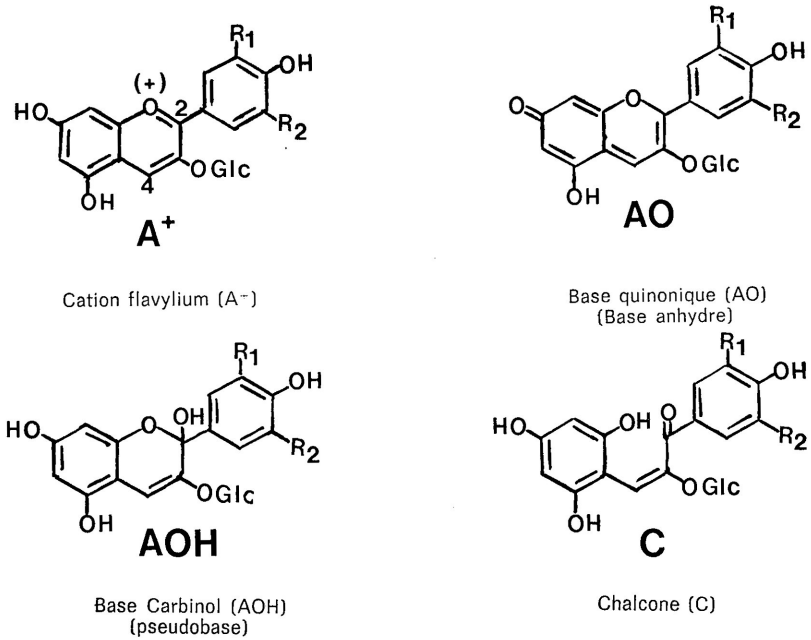


Fig. 1. — Les différentes formes des anthocyanes en milieu acide.

Les vitesses des trois réactions d'équilibre entre ces quatre molécules étant très différentes, chacun des équilibres peut être considéré séparément ; il s'agit de :

— l'équilibre de transfert de proton (acide-base) qui est très rapide (10^{-4} secondes) :

$$A^+ \leftrightarrows A0 + H^+ \qquad Ka = \frac{(A0)\ (H^+)}{(A^+)} \qquad pKa = pH + \log \frac{(A^+)}{(A0)}$$

— l'équilibre de solvatation (hydratation) qui est rapide (quelques secondes) :

$$A^+ \underset{+\ H_2O}{\overset{-\ H_2O}{\leftrightarrows}} A0H + H^+ \qquad Kh = \frac{(A0H)\ (H^+)}{(A^+)} \qquad pKh = pH + \log \frac{(A^+)}{(A0H)}$$

— l'équilibre de tautomérie qui est lent (quelques minutes, voire même quelques heures, en fonction de la température) :

$$A0H \leftrightarrows C \qquad K_t = \frac{(C)}{(A0H)}$$

Les réactions $A0 \rightarrow A^+ \rightarrow A0H \rightarrow C$ étant endothermiques, tous ces équilibres sont fonction de la température.

En outre, les auteurs précités ont montré que la réaction de déshydratation de la base carbinol en base anhydre ($A0H \rightarrow AO + H_2O$) envisagée par RIBÉREAU-GAYON (1973) n'est pas thermodynamiquement possible ; seuls les trois équilibres précédents interviennent en milieu acide.

Les différents substituants perturbent, suivant leurs positions, l'environnement électronique des carbones considérés et par conséquent la conjugaison des électrons π de la structure de base ; ces modifications entraînent des variations de la valeur des constantes précédentes.

La perturbation du carbone n° 2, intervient sur la réaction d'hydratation de la forme flavylium qui est soit plus facile (Kh augmente et pKh diminue), soit plus difficile (Kh diminue et pKh augmente).

La substitution électrophile du premier cycle benzénique entraîne en général une déstabilisation de ce cycle ; la réaction de transfert de proton conduisant à une plus grande stabilité de l'ensemble est alors facilitée (Ka augmente et pKa diminue).

La conséquence de la modification des valeurs de ces constantes, par rapport à la structure de base, est une répartition différente en fonction du pH, des quatre formes des anthocyanes ; ces nouvelles répartitions conduisent à des changements de couleur qui sont fonction du taux de cation flavylium (A^+ rouge) et de la base quinonique (A0 mauve).

ETUDE EXPERIMENTALE

I. — INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR LA COULEUR DE SOLUTIONS SIMPLES D'ANTHOCYANES

a) **Influence du solvant et des tanins sur les équilibres des anthocyanes.**

Conditions de l'expérience

Le but de cette expérience est de comparer à un pH donné, les équilibres des anthocyanes en présence et en absence de tanins. Les anthocyanes utilisées correspondent au mélange des cinq molécules présentes dans le raisin ; elles sont extraites des pellicules de Cabernet-Sauvignon. Leur composition déterminée par HPLC est la suivante : Malvidine monoglucoside (45 p. 100), Pétunidine monoglucoside (25 p. 100), Delphinidine monoglucoside (15 p. 100, Paeonidine monoglucoside (10 p. 100), Cyanidine monoglucoside (5 p. 100). Les tanins sont extraits des pépins des raisins ; ils comprennent des catéchines (25 p. 100), des procyanidines dimères du type B (45 p. 100) et des procyanidines polymérisées (30 p. 100).

On opère dans un milieu tamponné à pH 3,2 voisin de celui du vin (solution d'acide tartrique à 5 g par litre neutralisée au 1/3) avec et sans alcool (12 p. 100 vol.). Les concentrations par litre en anthocyanes et en tanins des solutions sont les suivantes :

Solution A : anthocyanes 325 mg ;

Solution A + T : anthocyanes 325 mg + Tanin 3 g.

Ces solutions sont maintenues à 20° C en présence d'air pendant la durée de l'expérience. On suit en fonction du temps (48 heures) l'évolution des densités optiques à 520 nm et à 350 nm, ainsi que la concentration en anthocyanes déterminée par la méthode utilisant l'hydrogénosulfite de sodium (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1965). Le temps 0 correspond à l'addition de la solution mère d'anthocyanes dans le milieu tamponné ; les mesures sont faites après obtention de l'équilibre concernant la base anhydre ; la variation mesurée, correspond à la fin de l'équilibre de formation de AOH et permet l'étude de l'équilibre de tautomérie.

Résultats (tableau I)

La solution hydroalcoolique d'anthocyanes est plus colorée que la solution aqueuse et se décolore un peu moins dans le temps. La solution qui contient les tanins présente une absorption plus élevée que la solution ne contenant que les anthocyanes ; en outre son absorption reste constante pendant 48 heures. On constate également, dans le cas des deux premières solutions une légère augmentation de la densité optique à 350 nm.

ISVV

Le résultat du dosage des anthocyanes, quelles que soient les solutions n'évolue pas en 48 heures.

Interprétation

En solution aqueuse, les équilibres de formation des bases carbinol du mélange sont assez lents et nécessitent à peu près 2 heures, la décoloration qui se poursuit correspond, d'après la théorie précédente, au déplacement de la réaction vers la forme chalcone ; l'augmentation de l'absorbance à 350 nm en est la preuve. Ce lent déplacement vers les formes incolores certainement dû à la température et à la nature du

TABLEAU I

Evolution en fonction du temps de la densité optique à 520 nm de différentes solutions d'anthocyanes à pH 3,2

Temps	Solutions				
	I		II		III
	d 520	décoloration %	d 520	décoloration %	d 520
3 minutes	0,295		0,374		0,390
10 »	—		0,372	0,5	0,388
30 »	0,290	1,7	0,360	3,7	0,390
1 heure	0,266	9,8	0,342	8,5	0,390
6 »	0,234	20,7	0,320	14,4	0,390
24 »	0,214	27,4	0,290	22,4	0,390
48 »	0,215	27,1	0,285	23,8	0,390

I : Solution aqueuse à 325 mg d'anthocyanes par litre
II : Solution hydroalcoolique (12 %) à 370 mg d'anthocyanes par litre.
III : Solution hydroalcoolique (12 %) à 354 mg d'anthocyanes et à 3 g de tanins par litre.

mélange, est ralenti en présence d'éthanol qui diminue les réactions d'hydratation de la forme flavylium ; il n'existe plus quand la solution présente des tanins. En considérant la masse moléculaire moyenne des anthocyanes égale à 500 et celle des tanins égale à 900, on constate que les molécules de tanins sont 6 à 7 fois plus nombreuses que celles des anthocyanes ; ces molécules semblent, en raison de leur caractère nucléophile, protéger les anthocyanes des réactifs extérieurs ; elles empêchent dans ce cas l'hydratation des anthocyanes. Cette protection est fonction de la quantité de tanins mise en jeu ; pour une même concentration en anthocyanes une solution ne contenant que 500 mg de tanin par litre se décolore légèrement, alors qu'avec 3 g de tanin par litre sa coloration reste stable.

b) **Influence du pH sur les équilibres des anthocyanes**

Conditions de l'expérience

Nous avons cherché à définir pour le mélange d'anthocyanes considéré, entre pH 3 et pH 4, la contribution à la couleur des deux formes colorées (flavylium A^+ et base quinonique A0). Les constantes Ka, Kh et K_t du mélange sont déterminées à 20 °C par la méthode de relaxation chimique appliquée à l'étude des sauts de pH, selon le mode opératoire défini par BROUILLARD et *al.* (1978).

Parallèlement, les mesures de densité optique à 520 nm des solutions aqueuses d'anthocyanes dont le pH est compris entre 3 et 4 sont effectuées au bout de deux heures de stabilisation des équilibres ; la comparaison de ces mesures à celles réalisées à pH = O (HCl N) permet d'obtenir le pourcentage de coloration de ces solutions.

En outre, compte tenu d'une part de la valeur à 520 nm des coefficients d'extinction moléculaire des formes flavylium (A^+) et quinonique (A0) déterminées par les mesures des sauts de pH et d'autre part, des équilibres de ces différentes formes, il est également possible de calculer les pourcentages de coloration des anthocyanes et de les comparer aux valeurs expérimentales précédentes.

Résultats

Pour la détermination des constantes d'équilibre, le milieu est thermostaté à 20 °C.

De pH 0 à pH 1,9, la variation de densité optique, concernant l'équilibre $A^+ \leftrightarrows A0 + H^+$, est la suivante : $Do = 1{,}056$; $D_1 = 0{,}647$

De pH 0 à pH 4,5, la variation de densité optique concernant le même équilibre est la suivante : $Do = 1{,}025$; $D_1 = 0{,}447$

De pH 0 à pH 6,0, les variations de densité optique concernant les différents équilibres sont les suivantes :

$A^+ \leftrightarrows A0 + H^+$	$Do = 1{,}018$; $D_1 = 0{,}393$
$A^+ \leftrightarrows A0H + H^+$	$D_2 = 0{,}199$
$A0H \leftrightarrows C$	$D_3 = 0{,}123$

Ces valeurs permettent de calculer, d'après les formules définies par BROUILLARD et *al.* (1978), les différentes constantes et les coefficients d'extinction moléculaire ; la concentration en anthocyanes déterminée par dosage est, suivant les dilutions utilisées pour les différents sauts de pH et en considérant la masse moléculaire moyenne des anthocyanes égale à 500 :

pH O → 1,9 C = 56,16 10^{-6} mole x l^{-1}
pH O → 4,5 C = 54,52 10^{-6} mole x l^{-1}
pH O → 6,0 C = 54,14 10^{-6} mole x l^{-1}

Ka = 38,9 10^{-5} M pKa = 3,41 εA^+ = 18800 M^{-1} cm^{-1}
Kh = 117,5 10^{-5} M pKh = 2,93 εAO = 7332 M^{-1} cm^{-1}
K_t = 0,61

L'étude de ces résultats conduit aux remarques suivantes :

Les valeurs des constantes sont différentes de celles qui ont été déterminées par BROUILLARD et *al.* (1978) pour la malvidine monoglucoside : pKa = 4,25, pKh = 2,6, K_t = 0,12, εA^+ = 27000, εAO = 14000.

Les proportions de formes quinoniques (A0) et chalcone (C) (tableau II) sont loin d'être négligeables pour les pH étudiés.

Les résultats concernant les pourcentages de couleur (tableau III) sont en accord avec les valeurs expérimentales ; ils montrent que la couleur des solutions de ces anthocyanes entre pH 3 et pH 4 est supérieure à celle de la malvidine.

Interprétation des résultats

Les équilibres des anthocyanes interviennent sur la couleur de ces solutions et conduisent entre pH 3 et pH 4 à la fois à plus de couleur rouge et à plus de couleur mauve par rapport à la malvidine monoglucoside. En effet l'hydratation des formes flavylium est un peu plus difficile, donc leur décoloration est moins importante ; la réaction de transfert de proton responsable de l'apparition de la couleur mauve, est par contre, facilitée. Cependant ces deux phénomènes sont quelque peu atténués par la réaction de tautométrie de la base carbinol qui est importante et entraîne une décoloration de l'ensemble. La vitesse de cette réaction fonction de la température est relativement lente à 20 °C ; la décoloration en fonction du temps, de la solution d'anthocyanes précédemment étudiée, est la conséquence de cette réaction ; elle n'intervient plus en présence de tanins.

c) **Influence du SO_2 sur les équilibres des anthocyanes**

Etude à pH constant

Conditions expérimentales

L'influence du SO_2 sur la couleur, donc sur les équilibres des anthocyanes, est étudiée à pH constant en présence et en l'absence de tanins. Les mesures sont effectuées en fonction du temps sur les solutions hydroalcooliques à pH 3,2 des pigments précédemment étudiés, après addition de quantités croissantes de SO_2 ; les solutions sont maintenues à 20 °C

TABLEAU II

Pourcentage des différentes formes d'anthocyanes entre pH 3 et pH 4, pour le mélange considéré, à 20° C

pH	A+	AO	A (OH)	C
3,0	30,6	11,9	35,7	21,8
3,1	25,8	12,6	38,2	23,3
3,2	21,7	13,4	40,3	24,6
3,3	18,0	14,0	42,2	25,8
3,4	14,9	14,5	43,9	26,7
3,5	12,2	15,0	45,2	27,6
3,6	9,9	15,4	46,4	28,3
3,7	8,0	15,7	47,4	28,9
3,8	6,5	16,0	48,1	29,4
3,9	5,2	16,2	48,8	29,8
4,0	4,2	16,3	49,4	30,1

TABLEAU III

Comparaison des pourcentages de couleur à 520 nm mesurés (1) et calculés (2) de la solution d'anthocyanes entre pH 3 et pH 4, avec ceux calculés (3) d'une solution de malvidine monoglucoside

pH	Pourcentages colorés		
	Mesurés (1)	Calculés (A+ + AO) (2)	Calculés (A+ + AO) (3)
3,0	36,1	35,2	26,6
3,1	31,0	30,7	22,5
3,2	25,1	26,9	18,9
3,3	22,0	23,5	15,7
3,4	19,6	20,6	13,1
3,5	16,7	18,0	10,8
3,6	14,6	15,9	9,0
3,7	13,1	14,1	7,4
3,8	11,8	12,7	6,2
3,9	11,0	11,5	5,2
4,0	9,6	10,6	4,3

(1) Les pourcentages sont définis par rapport à la couleur obtenue quand toutes les molécules sont sous forme flavylium pH = 0 (HCl N)

(2) Les valeurs sont calculées à partir des coefficients suivants :
$\varepsilon(A+)$ 520 = 18800 M^{-1} cm^{-1} ; $\varepsilon(AO)$ 520 = 7332 M^{-1} cm^{-1}

(3) Les valeurs sont calculées à partir des coefficients déterminés par BROUILLARD et **al** (1978) pour la malvidine monoglucoside
$\varepsilon(A+)$ 520 = 27000 M^{-1} cm^{-1} ; $\varepsilon(AO)$ 520 = 14000 M^{-1} cm^{-1}

en fioles bouchées. Parallèlement les teneurs en anthocyanes et en SO_2 libre du milieu sont contrôlées régulièrement. La comparaison des densités optiques mesurées, avec celles des témoins conservés dans les mêmes conditions, permet de calculer le pourcentage de décoloration des solutions.

Résultats (tableau IV)

La décoloration des anthocyanes n'est pas linéaire, les faibles doses d'anhydride sulfureux ont une action importante. En présence de tanins, les anthocyanes sont moins décolorées par l'anhydride sulfureux et se recolorent beaucoup plus rapidement au cours des 48 heures de réaction. Il faut plusieurs heures avec la solution d'anthocyanes pour atteindre l'équilibre (décoloration maximum) ; il est obtenu en 5 minutes en présence de tanins.

TABLEAU IV

Pourcentages de décoloration des anthocyanes en solution hydroalcoolique (12 %) et à pH 3,2 en présence et en l'absence de tanins, en fonction du temps et de la quantité de SO_2

Solution	SO_2 ajouté (mg/l)	Temps de réaction						
		3 mn	10 mn	30 mn	1 h	6 h	24 h	48 h
Anthocyanes	10	36	36	36	33	29	23	17
	20	58	58	57	55	55	40	38
	30	72	73	71	70	68	59	56
	50	84	85	84	84	82	79	78
Anthocyanes + tanins	10	34	33	28	25	22	6	2
	20	47	45	41	38	34	11	4
	30	59	56	55	55	48	32	14
	50	69	68	68	68	65	54	28

Concentration en anthocyanes : 270 mg/l = 54 x 10^{-5} mole x l^{-1}
Concentration en tanins : $\simeq$ 3 g/l

Le résultat du dosage des anthocyanes est constant pendant la durée de l'expérience mais la concentration en SO_2 libre (dosée) diminue régulièrement ; elle est nulle dans tous les cas au bout de 48 heures de conservation. Les anthocyanes sont donc encore décolorées avec une teneur apparemment nulle en SO_2 libre.

Interprétation

A pH 3,2, l'anhydride sulfureux réagit sous forme d'ion HSO_3^- avec les anthocyanes (figure 2). Il se fixe comme dans le cas de l'hydratation

de ces molécules, sur le carbone n° 2 ; le produit de la réaction est incolore ($AHSO_3$).

Les équilibres précédemment étudiés sont déplacés vers la formation de ce constituant. La mesure de la densité optique des solutions après addition de SO_2 permet d'une part de déterminer les nouvelles participations des quatre formes des anthocyanes à la couleur, d'autre part de calculer la valeur de la constante (K_s) de l'équilibre.

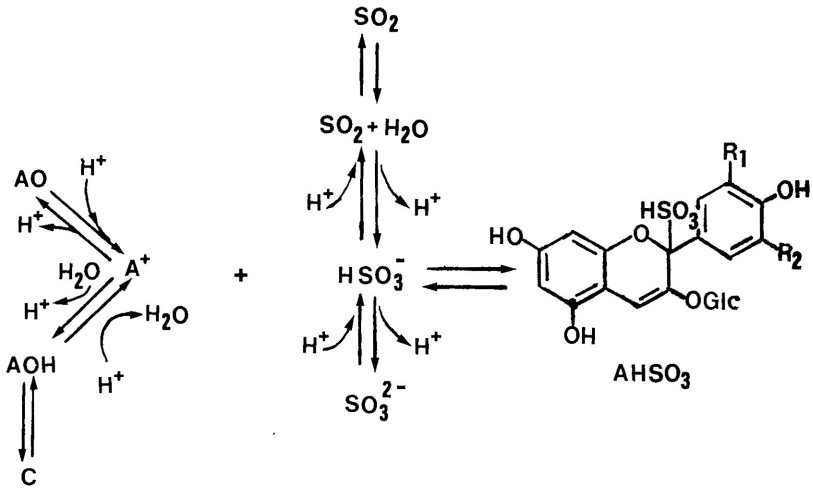


Fig. 2. — Equilibres des anthocyanes en fonction du pH et du SO_2

En effet, la densité optique à 520 nm mesurée sous 1 mm de parcours optique, correspond à la participation des formes flavylium et quinonique :

$$d = ([A^+]\ 18800 + [A0]\ 7332) \times 10^{-1}$$
$$d = ([A^+] + 0{,}39\ [A0])\ 1880$$

Elle peut être exprimée en fonction de $[A^+]$ uniquement, d'après l'équilibre entre A^+ et A0 (pKa = 3,41) et à pH 3,2 : $[A0] = 0{,}617\ [A^+]$

$$\text{d'où : } [A^+] = \frac{d}{2332}$$

Avec la quantité d'anthocyanes sous forme flavylium, ainsi déterminée, il est possible de définir grâce aux constantes précédentes, les concentrations des autres formes :

$$[A0] = 0{,}617\ [A^+]$$
$$[A0H] = 1{,}862\ [A^+]$$
$$[C] = 1{,}136\ [A^+]$$
$$[AHSO_3] = [A] - 4{,}615\ [A^+]$$

[A] est la concentration totale en anthocyanes.

La valeur de la constante K_s peut être calculée en connaissant la quantité de SO_2 ajouté à la solution :

$$K_s = \frac{[AHSO_3]}{[A^+]\,[HSO_3^-]} \quad \text{avec } [HSO_3^-] + [AHSO_3] = [S]$$

$[S]$ = quantité de HSO_3^- ajouté à la solution

ou

$$[S] = [SO_2 \text{ ajouté}] \times 0{,}9607 \left(\begin{array}{l} pK_1 = 1{,}81 \\ pK_2 = 6{,}91 \end{array} \right)$$

$$K_s = \frac{[AHSO_3]}{[A^+]\,([S] - [AHSO_3])}$$

Dans le cas des solutions d'anthocyanes étudiées (tableau IV), les densités optiques les plus faibles sont obtenues après 6 heures de réaction ; elles peuvent être considérées comme le point d'équilibre du système. Le calcul de K_s est satisfaisant pour les solutions qui ont reçu des additions de 30 et 50 mg par litre de SO_2 ; il ne l'est pas pour les concentrations plus faibles, certainement en raison d'une part de l'imprécision des méthodes de dosage du SO_2 et des anthocyanes, d'autre part de l'approximation concernant la masse moléculaire moyenne des anthocyanes ($M \simeq 500$)

K_s est de l'ordre de $10^5\ M^{-1}$

Avec cette valeur et pour les solutions à pH 3,2 contenant 54×10^{-5} mole $\times\ l^{-1}$, (tableau IV), les pourcentages de décoloration devraient être les suivants :

10 mg/l SO_2 → 25 %
20 mg/l SO_2 → 48 %
30 mg/l SO_2 → 66 %
50 mg/l SO_2 → 86 %

La valeur de cette constante est très voisine de celle de la cyanidine $K_s = 1{,}05\ 10^5\ M^{-1}$ (BROUILLARD, 1979), bien que les molécules étudiées soient plus difficilement hydratées (Kh) que la cyanidine et que la malvidine ; HSO_3^- est beaucoup plus réactif que H_2O.

En présence de tanins (tableau IV), on retrouve l'effet signalé précédemment ; les molécules de tanins, en raison de leur charge, protègent les anthocyanes, s'opposent à l'addition d'un réactif nucléophile (HSO_3^-) et déstabilisent dans une certaine mesure la molécule formée ($AHSO_3$).

La diminution du résultat du dosage du SO_2 libre au cours de l'expérience provient du départ du SO_2 sous forme gazeuse et de l'erreur absolue

due à la méthode de dosage peu précise pour les faibles valeurs ; l'éventualité d'une oxydation de SO_2 est peu probable en 48 heures en absence de catalyseur.

Ces résultats ont une application directe importante dans le cas du vin. Lorsque le résultat du dosage du SO_2 libre est nul, la couleur du vin peut être encore perturbée par la présence de quelques molécules de HSO_3^- encore combinées aux anthocyanes. En outre, le déplacement de l'équilibre par départ ou oxydation de SO_2 gazeux n'est jamais total ; il reste toujours un peu de HSO_3^- combiné aux anthocyanes. Il n'en est pas de même quand le milieu est acidifié ou quand on ajoute un excès d'éthanal.

Etude en fonction du pH et de la concentration en anthocyanes

L'étude des équilibres précédents montre que le pourcentage de décoloration des solutions d'anthocyanes dépend de trois facteurs : le pH, le SO_2 libre et la concentration en anthocyanes.

TABLEAU V

Pourcentages de décoloration de solutions d'anthocyanes à différents pH, en fonction du SO_2 ajouté.

pH	SO_2 libre (mg/l)	Anthocyanes (mg/l)			
		50	100	200	400
3,2	10	65	51	32	17,6
	20	83	74	59	34,6
	30	89	86	76	50,5
	50	93	92	89	75,8
3,4	10	58	46,8	30,8	17,5
	20	77	70,9	55,4	34
	30	84,5	81,4	71,7	49,1
	50	91	89,7	86,2	72,8
3,6	10	50,4	41	28,3	16,5
	20	70,1	64	50,7	32,2
	30	79,1	75	66	46,5
	50	87,1	85,5	81,4	68,5
3,8	10	42,2	35,3	25,5	15,7
	20	61,7	56,1	45,4	30,3
	30	71,8	68	59,5	43,3
	50	61,8	79,9	75,4	63,3
4,0	10	33,7	29	22	14,4
	20	52	47,5	39,2	27,5
	30	62,8	59,3	52	39,1
	50	74,6	72,6	67,9	57,2

Les calculs effectués (tableau V) pour cinq valeurs de pH, quatre concentrations en SO_2 et quatre teneurs en anthocyanes sont comparables aux résultats expérimentaux obtenus avec les solutions hydroalcooliques de ces pigments :

TABLEAU VI

Pourcentages de coloration de solutions d'anthocyanes en fonction de la concentration, du pH et du SO_2 ajouté, par rapport à la couleur de ces solutions à pH 4,0 pour lequel toutes les anthocyanes sont sous forme flavylium (rouge).

pH	SO_2 libre (mg/l)	Anthocyanes (mg/l)			
		50	100	200	400
3,2	0	26,9	26,9	26,9	26,9
	10	9,4	13,2	18,3	22,2
	20	4,5	7,0	11,0	17,6
	30	3,0	3,8	6,4	13,3
	50	1,9	2,1	3,0	6,5
3,4	0	20,6	20,6	20,6	20,6
	10	8,6	11,0	14,2	17,0
	20	4,7	6,0	9,2	13,6
	30	3,2	3,8	5,8	10,5
	50	1,8	2,1	2,8	5,6
3,6	0	15,9	15,9	15,9	15,9
	10	7,9	9,4	11,4	13,3
	20	4,7	5,7	7,8	10,8
	30	3,3	4,0	5,4	8,5
	50	2,0	2,3	3,0	5,0
3,8	0	12,7	12,7	12,7	12,7
	10	7,3	8,2	9,5	10,7
	20	4,9	5,6	6,9	8,8
	30	3,6	4,1	5,1	7,2
	50	2,3	2,5	3,1	4,7
4,0	0	10,6	10,6	10,6	10,6
	10	7,0	7,5	8,3	9,1
	20	5,1	5,6	6,4	7,7
	30	3,9	4,3	5,1	6,4
	50	2,7	2,9	3,4	4,5

Pour un pH donné et une valeur de SO_2 ajouté inférieure ou égale à 50 mg par litre, le pourcentage de décoloration des solutions est d'autant plus élevé que la concentration en anthocyanes est plus faible (tableau V). La conséquence œnologique est importante, elle montre l'influence de la

concentration en anthocyanes sur la couleur du vin rouge ; un vin riche en anthocyanes, même non combinées aux tanins, sera moins décoloré par les doses « normales de SO_2 » généralement utilisées pour la conservation (20 à 30 mg par litre), qu'un vin qui en possède peu.

Pour une concentration donnée en anthocyanes, le pourcentage de décoloration augmente avec la teneur en SO_2 et diminue avec le pH (tableau V) ; une solution d'anthocyanes à pH 4,0 est un peu moins décolorée par 30 mg de SO_2 par litre que la même solution à pH 3,2 en raison de la diminution de la quantité de molécules d'anthocyanes sous forme flavylium ; pour les faibles concentrations en anthocyanes (inférieures à 100 mg par litre), le pourcentage de coloration de ces solutions à pH 4,0 (tableau VI) est même supérieur à celui obtenu à pH 3,2 mais la couleur n'est pas la même ; la contribution des formes quinoniques est plus importante.

II. — EQUILIBRE DE LA FRACTION ANTHOCYANE DES COMBINAISONS TANINS-ANTHOCYANES

La conservation pendant deux mois d'une solution hydroalcoolique à pH 3,2 contenant un mélange de tanins et d'anthocyanes entraîne suivant les conditions, une variation de la couleur de cette solution (RIBÉREAU-GAYON, 1973) ; l'oxygène, surtout en présence de fer, est un facteur favorable à cette évolution. Elle provient de la combinaison de ces deux pigments, due à la réactivité des tanins d'une part à la formation d'éthanal à partir de l'éthanol d'autre part (TIMBERLAKE et BRIDLE, 1976 ; PONTALLIER, 1981).

Conditions expérimentales

L'influence de la nature des molécules de flavanes (catéchines, procyanidines oligomères) sur les caractéristiques chromatiques des combinaisons tanins-anthocyanes est étudiée en solution hydroalcoolique à pH 3,2 en présence d'éthanal formé par oxydation mais également ajouté.

Les anthocyanes et les tanins constitués de procyanidines oligomères correspondent aux mélanges étudiés précédemment, la (+) catéchine provient du commerce ; leur concentration par litre est de 300 mg pour les anthocyanes et de 3 g pour les flavanes. Toutes les solutions contiennent du fer et subissent une saturation d'oxygène au début de l'expérience. Une série de solutions reçoit un excès d'éthanal correspondant à une concentration de 340 mg par litre. Les mesures de densité optique à 520 nm et à 420 nm ainsi que le dosage des anthocyanes, sont effectués sur ces solutions, régulièrement pendant un mois ; la première mesure intervient après la saturation du milieu avec l'oxygène.

Résultats (tableau VII)

Dans tous les cas, la densité optique à 520 nm des mélanges, est supérieure à la somme des densités partielles correspondant aux anthocyanes (0,470) et aux tanins ou aux catéchines ($\simeq$ 0,010) ; elle est encore plus élevée en présence d'éthanal.

TABLEAU VII

Evolution en fonction du temps de la couleur de solutions contenant en mélange anthocyanes et (+) catéchine (C + A), anthocyanes et tanins constitués de procyanidines (T + A), en présence d'oxygène et de Fe^{3+}.

les anthocyanes sont exprimées en mg par litre

	Temps de réaction (jours)			
	0	2	8	30
	C + A			
d 420	—	0,218	0,196	0,337
d 520	0,547	0,702	0,454	0,223
Anthocyanes	466	465	460	214
	C + A + éthanal			
d 420	—	0,211	0,240	0,208
d 520	0,620	0,679	0,452	0,240
Anthocyanes	495	502	260	241
	T + A			
d 420	—	0,246	0,500	0,297
d 520	0,550	0,704	0,550	0,233
Anthocyanes	510	505	472	156
	T + A + éthanal			
d 420	—	0,250	0,132	0,052
d 520	0,600	0,570	0,198	0,128
Anthocyanes	480	496	212	45

Quand l'éthanal est ajouté, la réaction est très rapide, elle conduit à une augmentation de la couleur, suivie d'une diminution due à la précipitation des molécules polymérisées ; les tanins constitués de procyanidines sont beaucoup plus réactifs que les catéchines. Dans les autres cas, la réaction est un peu plus lente en raison de la formation progressive de l'aldehyde.

La densité optique à 420 nm des solutions, suit la même évolution ; la condensation des flavanes entraîne son augmentation et sa diminution après précipitation des molécules.

Parallèlement la teneur en anthocyanes, déterminée par la méthode utilisant la décoloration par le SO_2, diminue ; ces molécules sont masquées vis à vis de HSO_3^-, elles disparaissent par précipitation avec les polymères et elles sont également dégradées par oxydation. L'éthanal ajouté ou formé par oxydation de l'éthanol conduit à des combinaisons entre les tanins et les anthocyanes dans lesquelles les anthocyanes sont partiellement protégées des décolorations par hydratation (TAOH) et par HSO_3^- ($TAHSO_3$). La stabilité dans le temps de ces combinaisons dépend à la fois de la quantité d'éthanal formé, de la nature des flavanes et des conditions d'oxydation du milieu.

Interprétation des résultats

Il est certain que toutes les combinaisons entre ces pigments n'ont pas pour origine uniquement l'éthanal, d'autres modes de condensation, que nous verrons dans la suite de cet article, interviennent également mais avec des vitesses plus lentes. Dans tous les cas, on observe, comme l'avaient prévu BROUILLARD et EL HAGE CHAHINE (1979), des variations des valeurs des différentes constantes d'équilibre.

L'étude par relaxation chimique, de ces combinaisons isolées à partir d'un mélange de tanins et d'anthocyanes conservé pendant deux mois sans fer en présence d'air en est la preuve ; le fractionnement de ces pigments est obtenu par élution sélective des composés phénoliques de la solution, adsorbés sur pvpp (GLORIES, 1978)

$Kh = 22{,}39\ 10^{-5}\ M \qquad pKh = 3{,}65$
$Ka = 44{,}7\ \ 10^{-5}\ M \qquad pKa = 3{,}35$

Par rapport aux anthocyanes libres utilisées pKh augmente beaucoup et pKa diminue un peu ; K_t n'a pas été calculé, l'équilibre de tautomérie étant difficile à obtenir et les valeurs mesurées non reproductibles.

Ainsi la condensation des tanins et des anthocyanes diminue la réactivité du carbone n° 2 et favorise dans une certaine mesure la forme quinonique. Pour un pH considéré, la conséquence est d'une part une augmentation des couleurs rouge et mauve, d'autre part, une résistance à la décoloration de ces pigments par l'ion HSO_3^-. Cette diminution de réactivité du carbone n° 2 est liée soit à la perturbation de son environnement électronique en raison de la liaison avec les tanins, soit aux problèmes stériques qui empêchent le réactif d'atteindre ce centre électrophile. En effet on peut envisager pour ces combinaisons deux types de réactions :

1) Figure 3. Substitution du proton (en position 6 ou 8) d'une molécule d'anthocyane sous forme flavylium (A+) (cas du carbocation formé avec éthanal et catéchine ou éthanal et procyanidine) ou sous forme base carbinol (AOH) (cas du carbocation provenant de la dépolymérisation d'une procyanidine. (HASLAM, 1980).

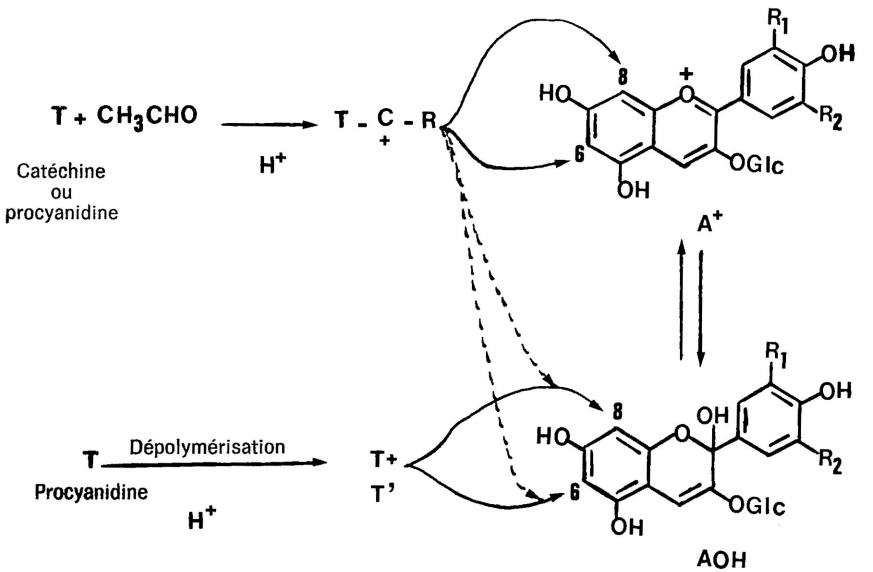


Fig. 3. — Réactions de substitution des anthocyanes par les tanins en présence et en l'absence d'éthanal.

Les complexes obtenus obéissent à de nouveaux équilibres fonction des perturbations électroniques et stériques apportées par les substituants. La substitution en position 8 apporte ces deux modifications ; la couleur doit être plus intense (plus rouge et plus mauve) et peu affectée par le SO_2. La substitution en position 6 n'intervient que dans la réaction de transfert de proton ; la couleur doit être plus sombre (plus mauve) également peu sensible au SO_2.

2) Figure 4. Association ionique entre le carbone n° 2 (éventuellement n° 4) d'une molécule d'anthocyane sous forme flavylium (A+) avec les sommets activés 6 et 8 des catéchines et des procyanidines. Ces associations s'opposent à la réaction d'hydratation et à la décoloration par HSO_3^- ; quand ces complexes sont colorés (après oxydation) la couleur rouge plus intense que celle des anthocyanes libres doit être un peu moins sensible au SO_2.

Il est certain que la structure de ces complexes et leurs propriétés sur la couleur restent encore à démontrer, cependant expérimentalement, on constate qu'un excès de SO_2 qui décolore la totalité des anthocyanes libres, intervient moins sur la couleur des combinaisons entre les tanins et les anthocyanes ; le pourcentage de décoloration est fonction de la structure des pigments formés.

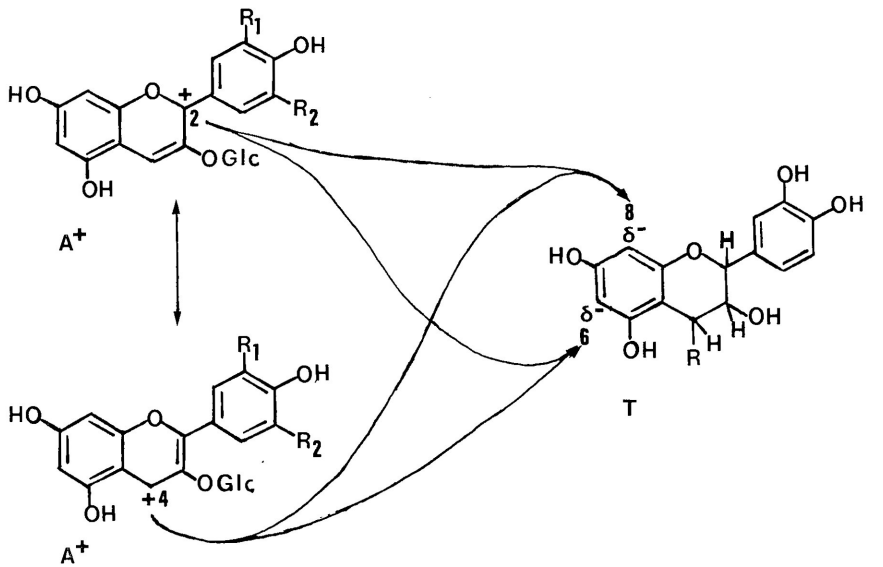


Fig. 4. — Possibilités d'association des anthocyanes et des tanins.

III. — INTERPRETATION DE LA COULEUR DU VIN ET DE SES VARIATIONS

La matière colorante du vin rouge jeune est constituée d'anthocyanes à l'état libre, de combinaisons plus ou moins complexes entre les tanins et les anthocyanes et de tanins condensés (GLORIES, 1978) ; celle du vin vieux ne possède plus d'anthocyanes libres, une partie de ces molécules est dégradée par oxydation, l'autre est combinée aux tanins qui sont également oxydés et présentent alors une teinte rouge-orangée.

La couleur des anthocyanes à l'état libre dépend naturellement de la quantité et de la nature des molécules présentes ; elle est surtout influencée comme nous l'avons vu précédemment, par le pH du vin, sa teneur en SO_2 libre et la concentration en tanins qui protègent dans une certaine mesure la forme flavylium (A^+).

La couleur des combinaisons tanins-anthocyanes et surtout leur teinte est variable selon la structure des molécules qui dépend beaucoup du

mode de conservation du vin (PONTALLIER, 1981). Elles sont moins sensibles au SO_2 et au pH que les anthocyanes à l'état libre ; suivant l'importance des formes rouges et bleues, le vin paraîtra plus ou moins foncé, plus ou moins sombre.

La couleur des tanins condensés est fonction de leur structure. La couleur jaune augmente beaucoup avec la polymérisation et avec l'oxydation des molécules (tableau VIII), elle se superpose à la couleur rouge précédente ; suivant l'importance de la couleur rouge, le vin paraîtra plus ou moins tuilé.

TABLEAU VIII

Evolution de la densité optique à 420 nm de solutions de flavanols plus ou moins polymérisés

(Solution hydroalcoolique à pH 3,2 en présence de fer et d'oxygène)

Temps de réaction (jours)	d 420 x 10^3				
	(+) catéchine	P 600	P 1000	P 1800	Mélange
0	16	70	95	163	97
1	36	100	120	206	129
4	60	212	204	320	170
8	300	400	350	330	260
15	677	1146	640	347	377
30	5350	7500	5030	2250	1220

P 600 : Procyanidines extraites des pépins de raisin dont la masse moléculaire est voisine de 600
P 1000 : Procyanidines oligomères extraites des pépins de raisin dont la masse moléculaire est voisine de 1000
P 1800 : Procyanidines polymérisées extraites des pépins de raisin dont la masse moléculaire est voisine de 1800

Par conséquent la couleur du vin correspond à la somme des trois couleurs, rouge, jaune et bleu qui dépendent de la nature des molécules et de leur degré de transformation.

Oxydation du vin

Nous avons vu que l'oxygène, s'il n'est pas en quantité trop importante, agit sur le vin lentement, comme facteur favorable à la transformation de sa matière colorante. Que se passe-t-il quand le vin conservé en milieu réduit (bouteille, cuve étanche), ou en présence d'oxygène (bouteille en vidange), est placé au contact de l'air ? Dans tous les cas on observe pendant les heures qui suivent, une augmentation de la couleur (tableau IX). L'aération brutale permet :

— de déplacer le SO_2 sous forme gazeuse, donc de libérer quelques molécules d'anthocyanes sous forme flavylium, même si le résultat du dosage du SO_2 libre est très faible, voire même nul,

— d'oxyder sous forme flavylium, la fraction anthocyane des combinaisons tanins-anthocyanes du type « flavène polymérisé », incolores en milieu réduit,

— d'oxyder les tanins en composés jaunes (qui augmentent l'absorption à 420 et à 520 nm) s'il n'y a pas de protection par le SO_2 (dernier vin du tableau IX).

Tableau IX

Evolution de la couleur de différents vins placés quelques heures au contact de l'air

Caractéristiques des vins	Temps de réaction (heure)	Oxygène dissous (mg/l)	SO_2 libre (mg/l)	d 420 x 10^3	d 520 x 10^3
Vin de 6 mois aéré	0	7,6	3	—	456
	24	7,1	0	—	625
	48	6,9	0	—	634
Vin de 6 mois réduit	0	1,6	18	—	270
	24	4,5	12	—	298
	48	7,9	5	—	421
Vin de 1 an conservé sans aération avec SO_2	0	—	10	140	200
	24	—	9	160	260
	48	—	8	240	380
	72	—	8	280	460
Vin de 1 an conservé sans aération sans SO_2	0	—	0	180	320
	24	—	0	360	390
	48	—	0	730	550
	72	—	0	730	560

CONCLUSION

La connaissance des constantes des quatre équilibres, en fonction du pH et du SO_2, des anthocyanes libres qui proviennent des pellicules de Cabernet Sauvignon, est très utile pour calculer le pourcentage de coloration des solutions de ces molécules et la contribution des deux formes A^+ et A0, à la composante rouge de leur couleur. Entre pH 3 et pH 4, ce pourcentage diminue de 35,2 p. 100 à 10,6 p. 100, à mesure que le pH augmente et la nuance de la couleur évolue du rouge au mauve. En présence de SO_2, le pourcentage de décoloration de ces solutions est une fonction inverse de leur concentration en anthocyanes ; les tanins,

quand ils sont en quantité suffisante, perturbent les équilibres en raison de leur caractère nucléophile.

Les combinaisons des anthocyanes avec les tanins entraînent des variations des constantes d'hydratation et de transfert de proton qui sont responsables entre pH 3 et pH 4 et par rapport aux anthocyanes libres, d'une augmentation plus ou moins importante des formes rouge et mauve ; la forme rouge est en outre plus ou moins décolorée, suivant sa structure, par un excès de SO_2. La couleur des solutions est plus intense que celles des anthocyanes libres, même en présence de SO_2, mais leur nuance dépend des valeurs de ces constantes donc de la nature des combinaisons.

Les équilibres de ces deux groupes de molécules interviennent dans le vin ; ils sont responsables de sa couleur et de ses variations.

Manuscrit reçu le 12 juillet 1984 ; accepté pour publication le 5 septembre 1984.

RÉSUMÉ

Les équilibres d'un mélange de cinq anthocyanes libres extraites de pellicules de Cabernet Sauvignon sont étudiés en fonction du solvant, de la teneur en tanins, du pH et de la concentration en SO_2 du milieu. Les différentes constantes de transfert de proton, d'hydratation et de tautomérie, ainsi que les coefficients d'extinction moléculaire des deux formes colorées sont déterminés en utilisant la technique de relaxation chimique de ces molécules appliquée aux sauts de pH ; ces résultats permettent de définir d'une part, la constante de la réaction des anthocyanes avec le SO_2, d'autre part de calculer la couleur des solutions de ces molécules. La même étude réalisée avec les combinaisons tanins-anthocyanes permet d'expliquer l'influence de leur structure sur la stabilisation de la couleur des solutions. L'origine chimique de la couleur du vin et de ses variations est discutée à la lumière de ces résultats.

SUMMARY

The study covers the equilibria of a mixture of five free anthocyanins from Cabernet Sauvignon skins, depending on the solvent, the tanin content, the pH, and the SO_2 concentration of the medium. The various constants of the proton transfer, cular extinction of the two coloured forms are determined using the technique of chemical relaxation of these molecules applied to the pH jump ; from these results, the constant of the reaction of the anthocyanins with the SO_2 on the one hand, and the calculation of the colour of the solutions of these molecules on the other hand, can be determined. From the same study with combinations between tanins and anthocyanins, it is possible to explain the influence of their structure on the stabilization of colour in the solutions. In the light of these results, the chemical origin of the wine colour and its variations are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Gleichgewichte einer Mischung von fünf freien Anthozyanen aus der Schale von Cabernet Sauvignon in Abhängigkeit von verschiedenen Lösungsmitteln, unterschiedlichen Gerbsäuregehalten, pH-Werten und SO_2-Konzentra-

tionen im Medium untersucht. Die verschiedenen Konstanten des Protonentransfers, der Hydratation und der Tautomerie sowie die Koeffizienten der Moleküllöschung der beiden farbigen Formen wurden durch auf pH-Sprünge angewandte chemische Entspannung der Moleküle bestimmt. Mit Hilfe der Ergebnisse kann einerseits die Reaktionskonstante der Anthozyane mit dem SO_2 definiert und andererseits die Farbe der Lösungen dieser Moleküle berechnet werden. Die gleiche Untersuchung mit der Verbindung Gerbsäuren/Anthozyane ermöglicht es, den Einfluss ihrer Struktur auf die Stabilisierung der Farben der Lösungen zu erklären. Auf Grund der Ergebnisse werden der chemische Ursprung der weinfarbe und ihre Schwankungen diskutiert.

RESUMEN

Se estudian los equilibrios de una mezcla de cinco antocianos libres estraidos de pieles de uvas de Cabernet Sauvignon, según el pH y las concentraciones en taninos y SO_2 en el medio. Aplicando los saltos de pH y utilizando la técnica de relajación química de estas moléculas se determinan las diferentes constantes de transferencia de proton, la hidratación y de tautomeria así como los coeficientes de extinción molécular de las dos formas coloreadas ; estos resultados permiten establecer por un lado la constante de reacción de los antocianos con el SO_2 y por otro lado, calcular los colores de las soluciones de estas moléculas. Un mismo estudio realizado con las combinaciones taninos-antocianos ha permitido explicar la influencia de su estructura sobre la estabilización del color en las soluciones. A la luz de estos resultados se discute el origen químico y las variaciones del color del vino tinto.

RIASSUNTO

Gli equilibrii d'una miscela di cinque antociani liberi estratte di pellicole di Cabernet Sauvignon sono studiate in funzione del solvente, del tenore di tanini, del pH e della concentrazione di SO_2 dell'ambiente. Le differenti costanti di trasferimento di protone d'idratazione e di tautomeria cosî come i coefficienti d'estinzione molecolare delle due forme colorante sono determinati quando si adopera la tecnica di rilassamento chimico di queste molecole, applicata ai salti di pH. Questi risultati permettono di definire, d'una parte la costante della reazione delle antociani con il SO_2, d'altra parte di stimare il colore delle soluzioni di queste molecole. Lo stesso studio realizzato con le combinazioni taninoantociani permette di spiegare l'influenza della loro struttura sulla stabilizzazione del colore delle soluzioni. L'origine chimica del colore del vino e delle sue variazioni é discussa quando studiamo questi risultati.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BROUILLARD R. et DUBOIS J.E., 1977. Mechanism of the Structurals Transformations of Anthocyanins in Acidic Media. *J. amer. chem. Soc.*, **99**, 1359-1364.

BROUILLARD R. et DELAPORTE B., 1977. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydratation, and tautomeric Reactions of Malvidin 3 - Glucoside *J. amer. chem. Soc.*, **99**, 8461-8468.

BROUILLARD R., DELAPORTE B. et DUBOIS J.E., 1978. Chemistry of Anthocyanin Pigments. 3. Relaxation Amplitudes in pH-jump Experiments. *J. amer. chem. Soc.*, **100**, 6202-6205.

BROUILLARD R. et DELAPORTE B., 1978. Etude par relaxation chimique des équilibres de transfert de proton, d'hydratation et de tautomérie prototropique de l'anthocyane majoritaire de *Vitis vinifera*, la glucoside-3 malvidine, *Protons and Ions Involved in Fast Dynamic Phenomena*, Elsevier Scientiific Publishing Company, Amsterdam, 403-412.

BROUILLARD R. et EL HAGE CHAHINE J.M., 1979. Chimie des pigments anthocyaniques. Stabilité des formes colorées et réactivité vis-à-vis du dioxyde de soufre. C.R. de l'Assemblée Générale Annuelle du Groupe Polyphénols, vol. 9, Narbonne.

GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Université de Bordeaux II.

HASLAM E., 1980, In Vino Veritas : Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, **19**, 2577-2582.

PONTALLIER P., 1981. Recherches sur les conditions d'élevage des vins rouges. Rôle des phénomènes oxydatifs. *Thèse Docteur-Ingénieur*, Université de Bordeaux II.

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

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. chim.*, **9**, 2649-2652.

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1966. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.*, **48**, 188-196.

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

SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. Agric.*, **7**, 203-208.

TIMBERLAKE C.F. et BRIDLE P., 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **27**, 97-105.