# UTILISATION DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE POUR LE DOSAGE DES CONSTITUANTS VOLATILS DU VIN

par A. BERTRAND (*)
Laboratoire d'Œnologie et Chimie agricole,
Faculté des Sciences de BORDEAUX

## PLAN

**INTRODUCTION** ..... 179

**Chapitre I. — ETUDE DES METHODES DE CONCENTRATION** ..... 181

— INTRODUCTION ..... 181

1° Problèmes à résoudre ..... 181

2° Technique des « Espaces de tête » ..... 182

3° Concentration par le froid ..... 183

4° Distillation et rectification ..... 183

a) *Distillation à pression ordinaire* ..... 183

b) *Entraînement par la vapeur* ..... 184

c) *Distillation sous vide* ..... 184

d) *Les huiles de fusel* ..... 185

5° Entraînement des substances volatiles par un courant gazeux ..... 185

a) *Systèmes utilisant le simple balayage par un gaz et le piégeage par le froid* ..... 185

(*) Ce mémoire a fait l'objet d'une Thèse de Doctorat en Chimie, mention Biochimie, soutenue à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux, le 17 septembre 1968.

b) *Système utilisant l'adsorption sur solides après entraînement gazeux* ..... 186

c) *Systèmes utilisant le piégeage par le froid après entraînement gazeux combiné avec le vide* .. 187

6° Extraction par solvants organiques ..... 187

7° Possibilité d'injection directe ..... 189

**Chapitre II. — TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE** ..... 190

1° Caractéristiques des appareils utilisés ..... 190

2° Choix des phases stationnaires ..... 191

3° Réalisation des colonnes ..... 192

4° Conditions opératoires ..... 195

**Chapitre III. — DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DU VIN PAR INJECTION DIRECTE** ..... 198

1° Généralités ..... 198

2° Conditions opératoires ..... 198

a) *Emploi des colonnes classiques en température programmée* ..... 198

b) *Emploi des colonnes semi-capillaires* ..... 200

c) *Emploi des colonnes classiques en isotherme.* 202

3° Description de la méthode de dosage ..... 202

4° Reproductibilité de l'injection ..... 205

5° Vérification chimique du dosage de l'acétate d'éthyle et du méthanol ..... 206

**Chapitre IV. — DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION** .... 209

1° Description du matériel ..... 209

2° Etude des paramètres dont dépend l'extraction ..... 211

a) *Généralités* ..... 211

b) *Influence de la saturation du vin par un sel minéral* ..... 212

c) *Influence du gaz vecteur* ..... 214

d) *Influence du temps d'extraction* ..... 215

3° Résultats ..... 216

a) *Identification des substances de l'extrait* .... 216

b) *Mise en évidence des esters de l'extrait* ..... 219

c) *Comparaison des extractions par l'azote et par le pentane* ..... 221

**Chapitre V. — DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DU VIN APRES EXTRACTION** ..... 224

1° Reproductibilité de l'extraction ..... 224

2° Influence du degré alcoolique sur la composition de l'extrait ..... 224

3° Proportionnalité de l'extraction en fonction de la concentration ..... 229

4° Détermination des coefficients d'extraction ..... 234

a) *Préparation des solutions témoins servant au dosage des substances de l'extrait* ..... 234

b) *Préparation des solutions servant à la détermination des coefficients d'extraction* ..... 235

c) *Extraction des solutions servant à la détermination des coefficients d'extraction* ..... 237

d) *Détermination des coefficients d'extraction à différents degrés d'alcool* ..... 237

5° Contrôle chimique du dosage chromatographique de l'acétate d'éthyle et du méthanol après extraction .... 237

a) *Dosage de l'acétate d'éthyle* ..... 238

b) *Dosage du méthanol* ..... 238

6° Contrôle du dosage chromatographique des substances volatiles après extraction ..... 239

**Chapitre VI. — APPLICATION DES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES AU DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DES VINS ET MILIEUX DE FERMENTATION** ..... 242

— INTRODUCTION ..... 242

1° Composition du milieu de fermentation ..... 242

2° Etude de fermentations de milieux synthétiques et de moûts ..... 243

a) *Influence de la qualité du saccharose* ..... 243

b) *Influence de la souche de levures* ..... 244

c) *Formation des substances volatiles, au cours de la fermentation, en fonction du degré alcoolique* ..... 247

3° Etude de quelques vins ..... 250

a) *Comparaison de quelques vins blancs de modes de vinification différents* ..... 250

b) *Comparaison de quelques vins rouges de modes de vinification différents* ..... 252

c) *Comparaison de trois vins de Sauternes d'âges différents* ..... 256

d) *Comparaison de quelques vins blancs différents* ..... 257

**CONCLUSION** ..... 260

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** ..... 264

## INTRODUCTION

La connaissance chimique des substances responsables de l'arôme des vins est loin d'être aussi avancée que celle des acides, des sucres, des polyphénols et des substances minérales.

Cette étude est rendue difficile parce qu'il intervient un grand nombre de substances actives à concentration très faible (inférieure à 1 mg/l). Aussi il est nécessaire de mettre en œuvre une technique de micro-analyse très précise et la chromatographie en phase gazeuse est particulièrement adaptée. Néanmoins, une analyse directe est rarement possible, aussi il faut faire une extraction préalable de ces substances, permettant leur concentration, avant de pouvoir en faire une étude chromatographique.

Un travail important a été réalisé à Bordeaux par BOIDRON et rapporté dans sa thèse soutenue en 1966 (1) ; cet auteur a recherché systématiquement une méthode d'extraction et de concentration permettant de mettre en évidence le maximum de substances volatiles responsables de l'arôme des vins ; après avoir essayé plusieurs possibilités, il a été amené à faire une extraction en continu par le pentane durant 240 heures ; il a montré également qu'aucune technique n'extrait correctement, en une seule opération, la totalité des substances volatiles.

A partir des extraits obtenus, cet auteur a identifié une soixantaine de substances en utilisant des techniques chimiques, chromatographiques et spectroscopiques.

Enfin la considération de rapports entre les concentrations de certaines substances identifiées a permis à BOIDRON de mettre en évidence des différences entre les vins étudiés, en fonction du cépage (Merlot et Cabernet-Sauvignon en rouge, Ugni Blanc, Sémillon et Sauvignon en blanc) et de différents modes de vinification. Il conclut : « Les divers arômes des vins résultent surtout de proportions différentes des mêmes substances, mais il n'y a pas de substance aromatique spécifique, tout au moins en quantité détectable avec les méthodes utilisées dans ce travail. »

Deux faits, résultant directement de la thèse de BOIDRON, ont guidé l'orientation de nos travaux : d'une part il faut étudier séparément, avec des méthodes d'extraction appropriées, les substances les plus volatiles

et les substances les moins volatiles, d'autre part il est indispensable de pouvoir effectuer des dosages des différentes substances pour comparer entre eux des vins d'origine variée.

C'est ainsi que nous avons été conduit à rechercher une méthode d'extraction et de concentration présentant les caractères suivants :

— Elle doit permettre d'extraire exclusivement la fraction la plus volatile des substances les plus odorantes du vin.

— Elle doit être reproductible pour permettre de faire des dosages des différents corps extraits.

— Elle doit être rapide pour permettre la comparaison d'un grand nombre d'échantillons.

Nous décrivons dans le premier chapitre de notre mémoire tous les modes d'extraction et de concentration des arômes, des boissons ou des produits alimentaires, signalés dans la littérature. L'un d'eux semblait particulièrement bien adapté à nos problèmes : l'entraînement des substances volatiles par un courant gazeux combiné avec un vide partiel, suivi de la récupération de ces substances dans des pièges réfrigérés. Nous avons mis au point un appareillage et un mode opératoire original (chapitres IV et V) qui conduit, en trente minutes, à une extraction permettant le dosage ; les esters volatils sont concentrés plusieurs centaines de fois.

Les analyses ont été faites par chromatographie en phase gazeuse et les techniques utilisées sont décrites dans le chapitre II. Pour étudier les extraits de vins, nous avons été amené à fabriquer nous-même des colonnes spéciales, en particulier des colonnes capillaires qui se sont révélées bien adaptées pour l'étude des substances volatiles des spiritueux, par injection directe ; cette possibilité d'injection directe peut aujourd'hui être étendue au vin grâce à la sensibilité très grande des détecteurs en service depuis quelques mois. Nous avons décrit dans le chapitre III le dosage des substances volatiles du vin, les plus concentrées, par injection directe ; ceci constitue une méthode à la fois simple et rapide mais valable uniquement pour certaines substances.

Enfin, le dernier chapitre de notre travail est consacré aux applications des méthodes d'analyse que nous avons mises au point. Nous avons ainsi étudié la formation des substances volatiles au cours de la fermentation, en fonction des conditions de milieu et de la souche de levure. Nous avons également comparé des vins de modes de vinification différents.

CHAPITRE I

# ETUDE DES METHODES DE CONCENTRATION

## INTRODUCTION.

Avant d'envisager les différentes techniques d'enrichissement des substances volatiles d'un vin, nous devons remarquer avec WEURMAN (2), que toutes les méthodes de concentration (distillation, adsorption, congélation, extraction) utilisent les lois de partage entre deux phases, la valeur du coefficient de partage dépend de la méthode mais aussi de la nature chimique de la substance envisagée ; il s'en suit que la proportion des constituants de l'extrait est forcément différente de celle qui préexistait dans l'échantillon original ; dans des milieux aussi complexes que les boissons ou les produits alimentaires, l'impression odorante varie donc lors de l'extraction et nous pouvons espérer uniquement une approche du problème et non sa résolution complète.

Dans le vin, les alcools sont suffisamment concentrés pour être étudiés par injection directe dans le chromatographe ; il en est de même pour l'acétate d'éthyle, mais pour les autres esters, une concentration préalable est nécessaire.

## 1° PROBLEMES A RESOUDRE.

On peut se proposer d'étudier soit les substances contenues dans le vin, soit celles contenues dans l'espace se trouvant immédiatement au-dessus du liquide et responsables de l'arôme de ce dernier. Il existe une technique dite de « head-space » et permettant d'analyser ces vapeurs, celle-ci semble séduisante car elle doit refléter exactement ce qui est perçu par l'odorat, malheureusement les détecteurs utilisés, à « ionisation de flamme », « sentent » les produits d'une manière différente du nez et surtout ils sont beaucoup moins sensibles (environ 100 fois) pour un grand nombre de composés ; dans le cas du vin il serait impossible de détecter par cette méthode certaines substances trop peu concentrées et qui cependant, par l'intensité de leur odeur, doivent jouer un grand rôle dans l'arôme du vin. Donc, bien qu'elle présente un intérêt certain, cette

méthode doit être complétée par une extraction du milieu étudié et, dans les paragraphes suivants, nous avons décrit les différentes méthodes de concentration signalées dans la littérature, de manière à choisir celle qui semblait la mieux adaptée à notre problème.

La distillation et la rectification furent les premières méthodes de concentration mises en œuvre ; elles ont permis d'étudier d'une part les huiles de fusel et d'autre part les produits volatils en utilisant la distillation sous vide et la récupération du distillat dans des pièges réfrigérés ou sur du charbon actif. Toujours parmi les méthodes physiques, l'entraînement des substances volatiles par un courant gazeux a été utilisé également avec récupération de l'éluat sur du charbon actif ou dans des pièges réfrigérés. Enfin, la méthode la plus utilisée est l'extraction par solvants organiques, soit en discontinu (en ampoule à décanter), soit en continu (en appareil de Soxhlet pour les solides ou de Kutscher-Steudel pour les liquides).

2° TECHNIQUE DES « ESPACES DE TETE ».

Cette technique très simple, connue sous le nom de « head-space » et dont nous avons précisé l'intérêt dans le paragraphe précédent, consiste à prélever quelques $cm^3$ de gaz surnageant le liquide, à l'aide d'une seringue à gaz et de les injecter dans le chromatographe ; elle fut préconisée par WEURMAN (3) et par MACKAY et **al.** (4) ; KEPNER et **al.** (5) l'ont rendue quantitative en la codifiant : 200 $cm^3$ de liquide saturé par $(NH_4)_2 SO_4$ ou NaCl pour diminuer la tension de vapeur de l'eau, sont placés dans un erlenmeyer de 500 $cm^3$ bouché par un film de paraffine ; on laisse l'équilibre s'établir durant 30 mn à 40 °C entre les deux phases ; à l'aide d'une seringue chauffée à 30-40 °C environ, on prélève de 5 à 10 $cm^3$ de gaz pour l'injecter dans le chromatographe. Pour rendre cette méthode quantitative, on ajoute dans le milieu étudié un étalon interne qui entre dans la composition de l' « espace de tête » et donne un pic dont la surface est considérée comme surface de référence pour tous les autres pics. De nombreux auteurs ont repris cette technique pour étudier la bière (6, 7, 8, 9), le rhum (10), certains produits alimentaires (4), le vinaigre (11), le café, le cacao et le thé (12).

En ce qui concerne le vin, nous ne connaissons que deux auteurs, RANKINE (13) et DUBOIS (14) qui aient utilisé cette méthode. Nous avons nous-même fait quelques essais desquels il découle que seul l'acétate de méthyl-3 butyle apparaît en plus des substances mises en évidence par l'injection directe. Cette technique de concentration n'est pas suffisante

pour révéler les esters, dont la faible teneur dans le vin n'exclut pas l'importance ; nous comprenons qu'elle ne se soit guère développée dans ce cas.

A la limite de la technique de l' « espace de tête » et de la distillation, la méthode de LEMPERLE et MECKE (15, 16) semble donner de bons résultats, puisqu'elle permet de concentrer une centaine de fois les esters du vin ; elle consiste à recueillir dans un piège à — 80 °C les vapeurs émises par du vin contenu dans un récipient dans lequel on a préalablement fait le vide.

3° CONCENTRATION PAR LE FROID.

Cette technique décrite par BIDMEAD (17) et par SHAPIRO (18), consiste à éliminer la plus grande partie de l'eau contenue dans le vin, la bière ou autre solution aqueuse, en la transformant en cristaux de glace. La solution à étudier est plongée dans un mélange réfrigérant à — 10 °C, tout en étant constamment agitée ; les cristaux se forment au voisinage de la paroi et peu à peu il ne reste à l'état liquide qu'un petit cône, au milieu du récipient, dans lequel se trouvent concentrées les substances aromatiques. Tout comme pour la méthode de l' « espace de tête », nous avons essayé cette technique, mais nous n'avons pas obtenu un enrichissement suffisant pour justifier une étude plus approfondie.

4° DISTILLATION ET RECTIFICATION.

Ces procédés furent, au début, les plus utilisés pour étudier les constituants de l'arôme du vin ou d'autres produits alimentaires ; il est maintenant reconnu que les hautes températures qu'ils nécessitent peuvent être responsables de modifications des concentrations de certains composants (hydrolyse des esters par exemple) ou de l'apparition d'artéfacts. Aussi ils sont aujourd'hui à peu près abandonnés, bien qu'ils aient permis de grands progrès dans la connaissance des substances responsables des arômes.

a) **Distillation à pression ordinaire.** — En distillant 1/10 du volume d'un échantillon de vin, RIBEREAU-GAYON (19) dose l'acétate d'éthyle avec une bonne précision. De même ÄYRÄPÄÄ (20), pour étudier la formation des alcools supérieurs de fermentation, recueille 15 $cm^3$ de distillat à partir de 100 $cm^3$ de milieu fermenté. HASHIMOTO et KUROIWA (21) distillent 10 $cm^3$ de bière à 78 °C en 90 mn à partir d'un échantillon de 200 $cm^3$ et obtiennent ainsi une concentration suffisante pour en faire une

étude par chromatographie en phase gazeuse. PRIBELA (22) distille directement dans la seringue à injection une petite quantité de jus de fruit ou de fruit broyé dans de l'eau ; cette technique très simple et très rapide permet de comparer les substances volatiles de différents fruits. SUNDT et WINTER (23) utilisent eux aussi la distillation pour étudier les arômes des framboises. Enfin, pour étudier les eaux de vie, POTTERAT et GYGI (24) utilisent un procédé spécial de distillation.

b) **Entraînement par la vapeur.** — KEPNER et WEBB (25, 26) étudient les substances volatiles du raisin après entraînement par la vapeur, alors que pour le vin (27) ils font une distillation suivie d'une extraction par l'éther. De même HONKANEN et KARVONEN (28) entraînent les substances volatiles des produits alimentaires par un courant de vapeur d'eau, le distillat étant récupéré dans des pièges à basse température et ensuite extrait par le chlorure d'éthyle.

c) **Distillation sous vide.** — REYMOND et **al.** (12) évaporent des suspensions aqueuses de café, cacao et thé à l'aide d'un évaporateur rotatif et recueillent le distillat dans des pièges réfrigérés, ce dernier est ensuite extrait par le chlorure de méthylène. STEVENS et **al.** (29, 30) extraient l'arôme de différentes variétés de raisins dans un appareil spécial fonctionnant sous un vide partiel à 71 °C et qu'ils appellent « Kontro wiped film evaporator ». S'inspirant de la méthode de STRATING et VENEMA (31), pour étudier le goût de papier conféré à la bière par une exposition au soleil, AHRENST-LARSEN et LEVIN HANSEN (32) utilisent un appareil de distillation sous vide avec piégeage du distillat ; celui-ci est ensuite extrait par le mélange éther-pentane (2-1, v/v). Toujours pour étudier la bière, VAN GHELUVE et **al.** (33) utilisent la lyophilisation suggérée par VAN DER KLOOT (34) pour ce genre d'étude. L'échantillon est lyophilisé sous « 1 μ » de pression et les substances volatiles sont condensées dans des pièges de formes spéciales, placés dans des mélanges réfrigérants à — 78 °C. L'injection directe de quelques $mm^3$ du « lyophilisat » donne de nombreux pics et cette méthode devrait pouvoir être appliquée avec succès à l'étude du vin. HERZ et CHANG (35) ont mis au point un appareil de distillation moléculaire fonctionnant sous un vide poussé (0,01 mm Hg) et permettant de récupérer entièrement les composés volatils des produits alimentaires ou des boissons, bien séparés des substances non volatiles, sans pour autant créer d'artéfacts occasionnés par les températures élevées ; le distillat, recueilli dans des pièges réfrigérés (— 80 °C et — 196 °C), est ensuite extrait par le mélange éther-pentane (2-1, v/v). Enfin WEURMAN (36) utilise un appareil d'évaporation sous vide, sur un échangeur de température en verre, pour

concentrer l'acétone et l'acétate d'éthyle d'une solution aqueuse, le distillat condensé dans des pièges à 0 °C et − 80 °C est enrichi une centaine de fois en ces deux corps.

d) **Les huiles de fusel.** — Les huiles de fusel constituent la fraction passant après l'éthanol lors de la distillation des solutions hydro-alcooliques ; leur étude a permis à de nombreux auteurs (37, 38, 39, 40) de faire avancer nos connaissances dans la composition des alcools supérieurs des produits fermentés.

5° ENTRAINEMENT DES SUBSTANCES VOLATILES PAR UN COURANT GAZEUX.

Cette technique, combinée ou non avec le vide, peut servir à entraîner les substances volatiles d'un liquide par barbotage et les substances émises par certains fruits ou autres produits alimentaires solides, en déplaçant l'atmosphère les environnant ; les substances entraînées par le gaz vecteur sont piégées sur du charbon actif ou dans des récipients réfrigérés par les mélanges suivants : eau + glace (0 °C), glace carbonique + acétone (− 80 °C) ou azote liquide (− 196 °C). Nous étudirons successivement les systèmes utilisant le balayage par un gaz à pression atmosphérique avec piégeage par le froid puis le piégeage sur un adsorbant ou dans un liquide, enfin les systèmes utilisant simultanément le balayage gazeux et le vide.

a) **Systèmes utilisant le simple balayage par un gaz et le piégeage par le froid.** — Dès 1960, NAWAR et FAGERSON (41) ont proposé un système très simple, où l'azote, après barbotage dans la solution à extraire, est déshydraté dans une colonne de $K_2CO_3$ puis piégé dans un tube en acier inoxydable, en forme de U et plongé dans l'azote liquide ; le gaz vecteur est ensuite recyclé grâce à une petite pompe (ce système diminue les pertes de matières volatiles) ; le tube réchauffé est ensuite placé dans le circuit gazeux d'un chromatographe au moyen d'un dispositif spécial (42) afin de balayer les substances qui avaient pu y être condensées. SWOBODA (43) préconise un tel piège pour récupérer les substances volatiles du lait et, reprenant le système de NAWAR et FAGERSON, POLLARD et **al.** (44) étudient les alcools supérieurs des cidres et poirés en condensant les substances entraînées dans deux pièges à − 80 °C, ce qui leur permet d'avoir un condensat suffisamment concentré pour l'injecter directement dans le chromatographe.

MABBITT et Mc KINNON, étudiant les substances volatiles du lait (45) et du fromage (45, 46), entraînent, durant un temps très court, les substan-

ces volatiles de quelques $cm^3$ d'échantillon et condensent les substances entraînées dans le corps de la seringue qui servira à faire l'injection, celle-ci se trouve dans un vase DEWAR contenant de l'azote liquide.

DRAWERT et BACHMANN (47) et DRAWERT et RAPP (48), utilisant un appareil à extraction semblable à celui de MABBITT et Mc KINNON (46), extraient le vin par un mélange $CO_2$-propane (1-1, v/v), les substances entraînées sont condensées dans deux pièges, l'un à 0 °C, l'autre à — 70 °C ; il faut ensuite éliminer le propane sans perdre de substances volatiles. Nous pensons que ce système doit pouvoir donner de bons résultats. Enfin, RANKINE (49), pour extraire l'hydrogène sulfuré produit par la fermentation, l'entraîne par un courant d'azote désoxygéné ; l'eau et les substances volatiles extraites sont condensées dans des pièges à — 80 °C ; l'hydrogène sulfuré est recueilli dans un piège à azote liquide.

b) **Système utilisant l'adsorption sur solides après entraînement gazeux.** — MONCRIEFF (50) suggéra le premier, en 1955, que les composés odorants pouvaient être identifiés par leurs caractéristiques d'adsorption ; pour cela il entraînait les substances volatiles des produits alimentaires par un courant d'air et les condensait sur diverses substances : charbon activé, gel de silice, alumine activée, terre à foulon, mélange de margarine et d'alumine activée (1-3, v/v). Reprenant cette méthode, OUGH et AMERINE (51) étudient le vin, différents fruits et vinaigres et déterminent le temps critique au bout duquel l'odeur dominante du produit étudié est éluée de l'adsorbant choisi. Le balayage par un gaz, avec condensation des substances entraînées sur du charbon actif, a été mis au point par STRACKENBROCK (52), puis repris par PAILLARD (53) pour étudier les substances émises par les pommes. Après fixation des substances volatiles, le charbon est ensuite lyophilisé puis désorbé sous un vide de $10^{-3}$ mm Hg à température ascendante jusqu'à 250 °C ; les substances sont recueillies dans des pièges réfrigérés. KOMODA et **al.** (54) condensent les substances volatiles entraînées à partir de la bière sur du charbon de noix de coco et les récupèrent ensuite par extraction avec le mélange éther-pentane (2-1, V/V). MEIGH (55), pour étudier les substances émises par les pommes, condense les vapeurs entraînées dans une série de pièges contenant de l'éther de pétrole. THOMPSON (56) estime que dans deux pièges en forme d'hélice, réfrigérés à — 80 °C, le premier recueille 95 % des substances récupérées et le second 5 %. KOMODA et **al.** (57, 58) étudient les composés volatils entraînés par le gaz carbonique lors de la fermentation du riz, pour la formation du saké ; ils effectuent un piégeage à 0 °C et à — 10 °C dans de l'éthanol pur ; de même, DRAWERT (59, 60) recueille dans des pièges réfrigérés le gaz carbonique de fermentation.

On peut rattacher à ce paragraphe le travail intéressant de RHOADES (61). Cet auteur étudie les substances volatiles du café moulu se trouvant dans un bain-marie à 100 °C. Ces substances sont entraînées par un courant d'hélium humide et condensées en tête d'une colonne de Carbowax, elle-même plongée dans de l'azote liquide ; après réchauffement de cette colonne, le gaz carbonique élué en tête est éliminé, les substances odorantes sont piégées à — 196 °C et elles sont étudiées par chromatographie en phase gazeuse ; l'eau est éluée en dernier.

c) **Systèmes utilisant le piégeage par le froid après entraînement gazeux combiné avec le vide.** — AURAND et **al.** (62) utilisent la distillation, sous un vide de 0,75 mm Hg à 35 °C durant deux heures, combinée avec un courant d'azote introduit par un capillaire au sein du liquide, en l'occurrence une culture de bacilles fermentant du jus de concombre ; le distillat est recueilli dans différents pièges réfrigérés et peut être étudié directement par chromatographie en phase gazeuse.

Enfin, nous-mêmes (63) avons mis au point un système permettant d'extraire par un courant d'azote, sous un vide partiel, les substances volatiles contenues dans les jus de fruits et boissons fermentées, de recueillir ces substances dans des pièges réfrigérés et les injecter directement dans le chromatographe ; la technique exacte, appliquée à l'extraction du vin, est présentée dans le chapitre IV de ce mémoire. En effet, nous avons choisi cette méthode d'extraction car elle permet de n'étudier que les composés très volatils, elle est rapide et reproductible, donc bien adaptée à une étude quantitative des substances odorantes volatiles des vins.

6° EXTRACTION PAR SOLVANTS ORGANIQUES.

L'extraction du vin par solvants organiques est, de loin, la méthode la plus employée pour l'étude des substances volatiles. Deux techniques principales ont été utilisées : l'extraction en discontinu (en ampoule à décanter) et l'extraction en continu. Les appareils fonctionnant en continu et comportant une extraction dite « à contre courant » ont été assez peu employés. Notons néanmoins que HEINZ et **al.** (64) ainsi que FLATH et **al.** (65) les utilisent pour extraire l'arôme des fruits. Pour extraire les vins en continu on utilise généralement un appareil de type « Kutscher-Steudel-perforator » (66) qui, revu par BOIDRON (67), permet d'utiliser, soit un solvant plus léger que le vin, soit un solvant plus lourd.

Les résultats obtenus dépendent beaucoup du solvant mis en œuvre, car l'extraction est rarement quantitative et le coefficient de partage varie en fonction des constituants.

BOIDRON (1) a fait une étude systématique des avantages et des inconvénients des solvants suivants : mélange éther éthylique-acétone (1-1, v/v), éther éthylique pur, mélange hexane-acétone (2-1, v/v), éther de pétrole, chlorure de méthylène, mélange éther éthylique-pentane (2-1, v/v) et enfin pentane pur ; cet auteur estime que le dernier est le meilleur solvant, à condition d'opérer durant deux cents heures au moins et de compléter cette extraction par une seconde avec le chlorure de méthylène durant trente heures. Il préfère cette solution à l'utilisation du mélange éther-pentane (2-1, v/v) : ce solvant permet bien l'extraction quasi totale en deux cent trente heures, mais dans ces conditions, l'extraction d'alcool est importante. En collaboration avec WEBB et RIBEREAU-GAYON (68, 69), BOIDRON utilise aussi le pentane. DRAWERT et **al.** (47, 48, 59, 60) extraient le vin par l'éther, le chlorure d'éthyle, le chlorure de méthylène ; ils obtiennent de bons résultats avec le mélange pentane-chlorure de méthylène (2-1, v/v) pour une extraction en continu durant douze heures. Nous avons nous-même fait des essais systématiques de recherche d'azéotropes entre le pentane et le chlorure de méthylène et nous avons trouvé que le mélange pentane-chlorure de méthylène (7-3, v/v), qui possède un point d'ébullition voisin de 32-33 °C, est particulièrement bien adapté à une extraction en continu, de courte durée.

MECKE et de VRIES (70) et MECKE et **al.** (71) ont proposé le mélange azéotrope éther éthylique-pentane (2-1, v/v), utilisé depuis par de nombreux chercheurs ; le travail le plus important à l'aide de ce solvant est sans doute celui de MAARSE et ten NOEVER de BRAW (72) qui étudient le rhum. Ce mélange a aussi été repris par LEMPERLE et MECKE (15, 73, 16), par PRILLINGER et **al.** (74, 75), par BARAUD (76, 77), par FLANZY et JOURET (78) et par d'autres auteurs (31, 32, 33, 37, 40, 79).

Parmi les autres solvants mis en œuvre, nous citerons l'éther de pétrole utilisé par PEYNAUD (80) dès 1937 pour étudier le rôle des esters dans le vin ; le pentane employé par HENNIG et VILLFORTH (81) en 1942 pour extraire les substances volatiles de 360 litres de vin ; le chlorure de méthylène fut utilisé par VAN WYK et **al.** (82) pour étudier le vin et le raisin de variété « White Riesling ». Le chlorure d'éthyle, dont le point d'ébullition est très bas (12, 1 °C), fut mis en œuvre par DRAWERT (48) pour étudier le vin, ce solvant a été également employé pour étudier l'arôme des pommes [MATTHEWS et **al.** (83)] et d'autres produits alimentaires (28). L'éther éthylique entre dans la composition de nombreux solvants complexes : éther-pentane (1-1, v/v) de BAYER et BÄSSLER (84) pour étudier les esters du vin, éther-isopentane (1-1, v/v) de FLATH et **al.** (65), éther-éther de pétrole (1-1, v/v) de de CLERCK et DELAUNOY (85)

pour étudier les substances volatiles de la bière. L'isopentane fut utilisé par de nombreux chercheurs au cours des dernières années : SUOMALAINEN et NIKANEN (86) pour rechercher les composés volatils formés lors de la fermentation de solutions sucrées, MEHLITZ et GIERSCHNER (87) pour étudier l'arôme des fruits et des légumes, enfin STEVENS et **al.** (30, 88) pour étudier les substances volatiles des raisins « Grenache » et « Concord » ; ces derniers auteurs ont utilisé l'éther pour étudier le « Muscat d'Alexandrie » (29).

Enfin nous devons citer le travail de POWELL et BROWN (89) qui extraient 70 $cm^3$ de bière par 0,5 $cm^3$ de sulfure de carbone purifié ; l'avantage de ce système est que le $CS_2$ n'est pas détecté par l'ionisation de flamme et il n'y a donc pas besoin de faire une concentration préalable.

7° POSSIBILITE D'INJECTION DIRECTE.

Jusqu'à ces dernières années, l'étude des substances volatiles du vin ne pouvait se faire qu'après une extraction, qui avait pour but de concentrer les corps car les détecteurs étaient peu sensibles, mais aussi d'éliminer l'eau car les détecteurs à thermistances donnaient pour ce corps un gros pic masquant de nombreuses substances. L'apparition de détecteurs à ionisation de flamme, très sensibles aux composés organiques et pratiquement insensibles à l'eau, permit d'envisager l'introduction directe de l'échantillon dans la colonne, sans aucune manipulation préalable ; les pics obtenus sur le chromatogramme étant mesurables avec une bonne précision, on obtient ainsi directement une indication quant à la concentration des substances du milieu étudié, sans recourir aux coefficients d'extraction. Certains travaux ont pu déjà être réalisés sur des produits distillés ; FOUASSIN (90) en 1959 opérait après élimination de l'eau des échantillons par passage sur une colonne de $K_2CO_3$ ; depuis, les principaux travaux ont été réalisés par DRAWERT et **al.** (91), SINGER et STILES (92, 93), DELUZARCHE et **al.** (94), KABOT et ETTRE (95), PRILLINGER et HORWATITSCH (96). Nous-mêmes (97) avons mis au point une colonne permettant de séparer les principaux constituants volatils des spiritueux après injection directe.

En 1965, LEMPERLE et MECKE (16) étudièrent le vin par injection directe et nous-mêmes (98) avons déjà, dans ce domaine, de nombreux résultats. OUGH et **al.** (99) injectent directement le distillat (v/v) du vin (après avoir vérifié qu'ils recueillent par distillation la totalité des substances intéressantes) pour étudier la formation des alcools supérieurs à différentes températures de fermentation.

CHAPITRE II

# TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE

## 1° CARACTERISTIQUES DES APPAREILS UTILISES.

La seule méthode valable à l'heure actuelle, pour étudier les arômes, est la chromatographie en phase gazeuse. Au début de notre étude, nous avions à notre disposition un appareil de marque « Perkin-Elmer » type « 116 E » de conception ancienne, fonctionnant avec des colonnes de « 1/4 de pouce » (1 pouce = 2,54 cm). Le détecteur de cet appareil est à ionisation de flamme, mais il est peu sensible par rapport à ceux des appareils récents ; d'autre part, le four est mal étudié pour recevoir les très longues colonnes souvent nécessaires pour étudier des produits très volatils. Nous nous sommes peu servi de cet appareil, car nous disposions d'un second chromatographe, de marque « Aerograph » type « 204 », pouvant fonctionner avec deux colonnes de 1/8 de pouce, plus fines donc plus efficaces ; il possède deux circuits de gaz vecteur, deux détecteurs à ionisation de flamme plus sensibles que celui de l'appareil précédent, deux électromètres pouvant fonctionner en « différentiel » ce qui est nécessaire, lorsqu'on travaille en température programmée, pour compenser la dérive de la ligne de base ; en effet, les lois de DALTON et de HENRY appliquées à l'équilibre entre la vapeur et le liquide donnent (100) :

$\text{Log } V = \frac{K_1}{T} + K_2$ où $K_1$ et $K_2$ sont des constantes, T est la température absolue, V peut être assimilé au volume de rétention du corps envisagé (le volume de rétention d'un corps est le volume de gaz vecteur sortant de la colonne entre l'entrée de ce corps et sa sortie de cette colonne). Nous voyons donc, d'après cette formule, qu'une augmentation de température a pour effet de diminuer le volume de rétention du corps envisagé donc son temps de rétention (temps que met le corps injecté pour traverser la colonne) qui lui est à peu près proportionnel. Il est intéressant de pouvoir augmenter la température, à l'aide d'une programmation automatique, en cours d'analyse, pour pouvoir diminuer le temps de rétention de certaines substances, ce qui augmente la hauteur de leurs pics sur le chromatogramme sans pour autant diminuer la finesse de la séparation. Mais une augmentation de température se traduit par une perte accrue

de la colonne en phase stationnaire, avec comme conséquence le déplacement de la ligne de base ; il convient d'annuler cette modification en lui opposant le signal créé par une colonne identique, placée dans les mêmes conditions de débit de gaz vecteur et de température, mais ne recevant pas le mélange à analyser. On peut également utiliser cet appareil en isotherme lorsque les extraits ne possèdent que des composés très volatils, ceci permet d'obtenir une meilleure précision, on peut aussi, dans ces conditions, effectuer deux analyses simultanées en reliant chaque détecteur à un enregistreur.

A la fin de notre expérimentation (juin 1967) nous avons eu à notre disposition, un nouvel appareil de marque « Aerograph » type « 1200 » possédant un détecteur à ionisation de flamme très sensible, à électronique entièrement transistorisée et permettant d'avoir une ligne de base très stable à sensibilité élevée et par conséquent de faire des dosages précis. Cet appareil nous a permis de mettre au point le dosage de nombreuses substances volatiles du vin par injection directe. Bien que ne possédant qu'une seule colonne, cet appareil est équipé d'un programmateur de température et nous l'avons utilisé pour faire une étude qualitative des substances décelables par injection directe, de poids moléculaire relativement élevé et sortant après le méthyl-3 butanol-1.

2° CHOIX DES PHASES STATIONNAIRES.

Nous avons essayé un grand nombre de phases stationnaires différentes et nous n'avons retenu que celles qui donnent les meilleures séparations pour un même extrait. Dans des colonnes de 1/8 de pouce, nous avons utilisé les phases stationnaires suivantes :

**E.S.D.** Erithrytol 0,25 % + Sorbitol 2,25 % + Diglycérol 7,5 % enrobant du « Chromosorb P. » « 60-80 mesh », colonne en cuivre de 7,5 m. Cette colonne a été utilisée par BOIDRON (1) ; nous avons trouvé qu'elle avait des performances à peu près identiques à celle constituée par du Diglycérol à 10 % sur du « Chromosorb P », mais elle présente l'avantage d'être plus stable.

Cette colonne, lorsqu'elle est neuve, possède un remarquable pouvoir de séparation des esters volatils ; d'autre part, elle permet la séparation des deux alcools isomères méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1, elle vieillit assez rapidement, après un mois de service elle doit être refaite.

**C + H :** Carbowax 400 à 5 % + Hallcomid M-18 OL à 1 %, enrobant du « Chromosorb W. » « 60-80 mesh » régénéré à 850 °C durant quatre heures. Cette colonne est en cuivre, elle mesure 6 m. Nous avons mis au point cette formule originale (98) pour séparer par injection directe les alcools

volatils des spiritueux, ainsi que l'éthanal et l'acétate d'éthyle, nous nous sommes basé sur le fait que la colonne de Hallcomid M-18 OL fait sortir le méthanol avant l'acétate d'éthyle et l'éthanol, mais mal séparé et que la colonne de Carbowax 400 fait sortir le méthanol entre l'acétate d'éthyle et l'éthanol, mais imparfaitement séparé de ce dernier ; en rajoutant de l'Hallcomid à cette phase stationnaire, on diminue le temps de rétention relatif du méthanol qui se trouve ainsi parfaitement séparé de l'éthanol. Néanmoins cette colonne ne permet pas la séparation du méthyl-2 propionate d'éthyle et du propanol-1 d'une part, du méthyl-3 butyrate d'éthyle et du méthyl-2 propanol-1 d'autre part.

**Carb. 1540 :** Carbowax 1540 à 10 % enrobant du « Chromosorb W. », « 60-80 mesh », régénéré à 850 °C durant quatre heures, colonne en cuivre de 7,5 m. Une colonne identique, en version 1/4 de pouce, avait été utilisée par PAILLARD (52) pour l'étude des substances volatiles des pommes.

Cette colonne est bien adaptée à l'étude des boissons fermentées, par injection directe ; en outre elle complète la colonne ESD pour l'étude des esters volatils qui ne sont pas séparés sur cette dernière. Elle présente deux défauts : elle ne permet pas la séparation du méthyl-2 butanol-1 et du méthyl-3 butanol-1 d'une part, de l'acétal et de l'acétate d'éthyle d'autre part.

**N.P.G.A. :** Polyadipate de néopentyl-glycol à 10 % enrobant du « Chromosorb W. » « 60-80 mesh », colonne de 4 m en acier inoxydable.

**Hall. :** Hallcomid M-18 OL à 20 %, enrobant du « Chromosorb W. », colonne de 4 m, en cuivre ; elle permet d'obtenir d'excellentes séparations mais cette phase stationnaire est peu stable et donne des temps de retention variables.

**Carb. 400 :** Carbowax 400 à 10 % enrobant du « Chromosorb W. », colonne de 6 m, en cuivre ; cette phase stationnaire est comparable au Carbowax 1540, mais elle donne une moins bonne séparation du méthanol, elle est bien adaptée à l'étude des substances volatiles des raisins.

**PK :** Porapak Q « 120-150 mesh » support réticulé pouvant opérer sans phase stationnaire, colonne de 4 m en acier inoxydable. Cette colonne est intéressante par les séparations spéciales qu'elle permet. Cependant, elle est mal adaptée à l'étude des traces, qui souvent disparaissent en cours d'analyse.

3° REALISATION DES COLONNES.

Nous avons toujours fabriqué nos colonnes nous-même d'abord parce que nous pouvions ainsi faire varier les proportions de phase stationnaire

et avoir les colonnes les mieux adaptées à nos problèmes, c'est ainsi que nous avons été amené à allonger les colonnes de 4 m à 6 m et même 7,5 m ; ensuite parce que nous pouvions apporter à leur réalisation tout le soin nécessaire pour obtenir des séparations identiques, répondant à des critères bien définis pour pouvoir faire des dosages ; enfin parce que le prix de revient de ces colonnes est cinq fois plus faible que celui des colonnes commerciales dont les caractéristiques sont le plus généralement inférieures.

Pour fabriquer une colonne nous commençons par retamiser le support (Chromosorb) sur tamis n° 23 et 24 (normes AFNOR) et nous le portons au four à 850 °C durant quatre heures ; nous faisons cette opération systématiquement (sauf pour les supports silanisés) car nous nous sommes aperçu qu'une telle opération améliore le pouvoir de séparation de la colonne, pour les substances volatiles ; le support est ensuite ramené à température ambiante, sous vide, dans un dessicateur contenant du chlorure de calcium.

Nous pesons ensuite une quantité de support en léger excès pour remplir le tube choisi pour faire la colonne. Ce poids de support permet de calculer celui de la phase stationnaire. Le pourcentage de phase stationnaire est déterminé empiriquement, en faisant plusieurs colonnes de proportions différentes ; il est généralement le dixième du poids total (support + phase stationnaire).

Le poids voulu de phase stationnaire est dissout dans un solvant volatil approprié : chlorure de méthylène, acétone ou méthanol le plus souvent. Le support est ensuite immergé complètement dans le solvant contenant la phase stationnaire et l'ensemble placé dans un ballon de 250 $cm^3$, hérissé de pointes intérieures d'environ 1 cm de hauteur (fig. 1). Le solvant est chassé grâce au vide d'un évaporateur rotatif sans qu'il n'y ait jamais ébullition, de manière à ne pas perdre de phase stationnaire par entraînement mécanique ; le ballon tourne très lentement, les pointes permettent le mélange du support, d'une manière tout à fait satisfaisante, sans pour autant briser les grains de « Chromosorb ». Cette opération doit être conduite avec beaucoup de soin jusqu'à obtention d'une poudre sèche. Lorsque le support est sec, la température du bain-marie est amenée progressivement à 100 °C et y reste maintenue pendant une heure, de manière à dessécher complètement le support ; cette opération évite le passage au four à 105 °C, à l'air qui risque de provoquer une oxydation de certaines phases stationnaires.

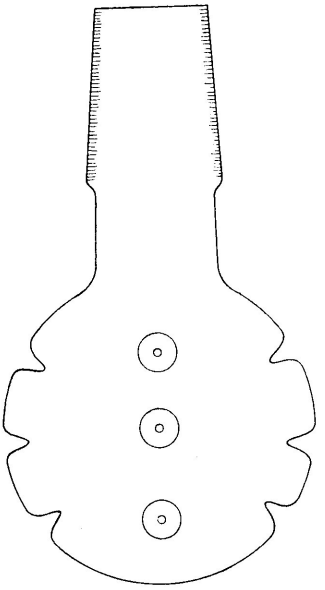


Fig. 1. - Ballon servant à la préparation du support imprégné.

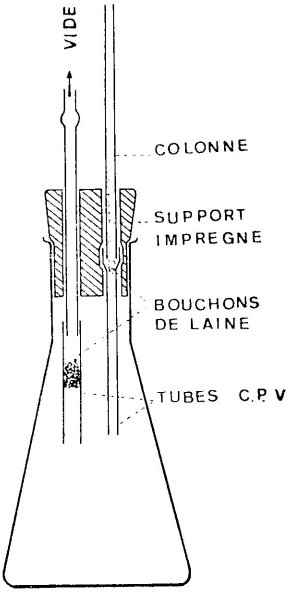



Fig. 3 - Fiole permettant de faire le vide dans la colonne pour son remplissage.

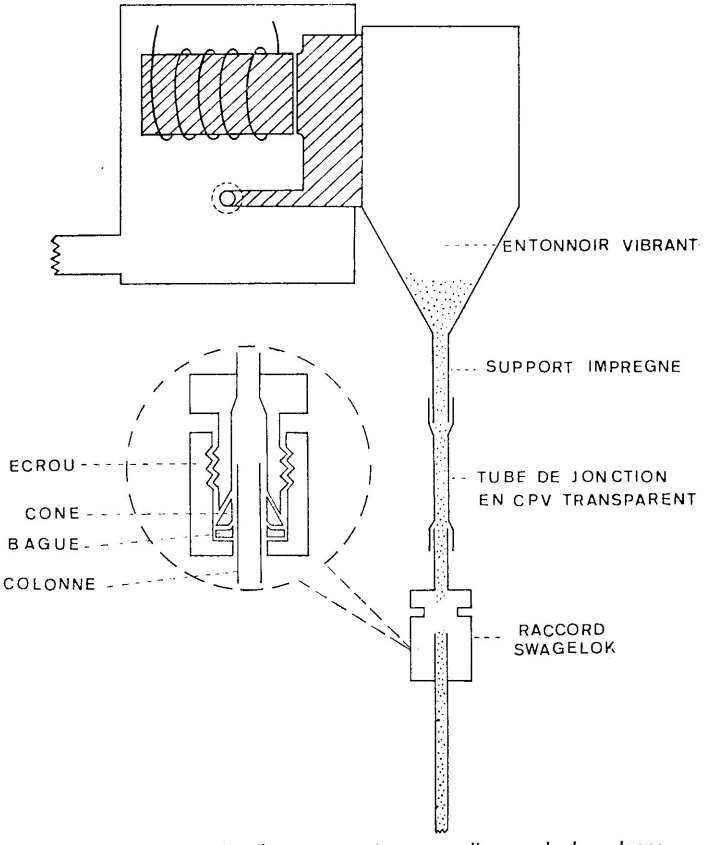



Fig. 2. - Entonnoir vibreur servant au remplissage de la colonne.

Après avoir été ramené à température ambiante, dans un dessicateur sous vide, le support imprégné est prêt pour le remplissage du tube ; pour cette opération, nous disposons d'un petit entonnoir vibreur (fig. 2), placé à 2,5 m de haut, il possède à son extrémité inférieure un raccord «swagelok » qui permet de le relier directement à la colonne, l'autre extrémité du tube, bouchée à l'aide d'un tampon de coton de verre, est fixée à une fiole à vide (fig. 3), reliée elle-même à une pompe à palettes. Le support imprégné descend peu à peu dans le tube grâce aux vibrations de l'entonnoir, au vide et aussi au martèlement qu'on imprime tout au long de la colonne à l'aide d'une spatule plate. Il convient d'apporter un très grand soin au remplissage du tube, car si elle n'est pas uniforme, la colonne perd son pouvoir de résolution et souvent est inutilisable.

Une fois remplie, la colonne est bouchée à ses deux extrémités à l'aide de tampons de coton de verre ou de laine de pyrex et enroulée en spirale sur un mandrin de 15 cm de diamètre. Elle est ensuite placée dans le four du chromatographe où elle sera stabilisée durant quelques heures à température généralement supérieure à celle de son utilisation normale ; durant cette opération, l'extrémité de la colonne n'est pas reliée au détecteur, de manière à éviter que des particules provenant de la phase stationnaire ne viennent le souiller et perturber son fonctionnement.

Après avoir été stabilisée, la colonne est prête à fonctionner ; les conditions optima de température et de débit de gaz vecteur ayant été fixées, cette colonne doit donner de bons résultats c'est-à-dire une ligne de base stable et un bon pouvoir de résolution. Les qualités diminuent continuellement au cours du vieillissement ; par exemple une colonne de ESD sépare l'acétate de méthyl-3 butyle de l'éthanol, uniquement durant les premières heures de son fonctionnement. Une bonne colonne dure environ trois à quatre mois, quel que soit le volume qu'elle ait reçu à analyser.

## 4° CONDITIONS OPERATOIRES.

Le choix correct des conditions opératoires est très important pour avoir de bonnes séparations. A titre d'exemple, quand nous avons commencé notre travail, nous mettions en évidence cinq ou six pics mal résolus, pour certains extraits, peu à peu nous avons amélioré les techniques opératoires de telle sorte que maintenant nous obtenons jusqu'à 27 pics avec les mêmes extraits.

Pour régler un appareil de chromatographie nous opérons comme suit :

La colonne, préalablement stabilisée, est branchée à l'intérieur du four, dont la température a été réglée de telle sorte que le temps de rétention du dernier constituant élué de la colonne n'excède pas 45 mn (généralement 30 mn). Nous faisons ensuite varier le débit du gaz vecteur dans la colonne, de 30 à 10 $cm^3$/mn, pour une colonne classique de 1/8 de pouce, de manière à avoir le plus grand nombre de plateaux théoriques, conformément à la loi de Van DEEMTER (101), en effet, plus la hauteur équivalente à un plateau théorique sera faible (fig. 4), meilleure sera la séparation. Lorsque cette amélioration du pouvoir de résolution n'est pas évidente, dans un domaine de débit de gaz vecteur assez important, nous choisissons toujours le débit maximum, de manière à avoir les pics les plus hauts possible. Bien souvent une amélioration dans le pouvoir de résolution de la colonne peut être apportée en changeant de gaz vecteur (Hydrogène, Hélium), mais les changements ne sont jamais très importants et nous avons préféré utiliser de l'azote « R » pour des raisons économiques.

Le débit de gaz vecteur étant réglé, il convient d'ajuster celui de l'hydrogène dans le détecteur à ionisation de flamme ; en effet, conformément aux résultats publiés dans le manuel de TRANCHANT (102) et dont nous avons reproduit une courbe (fig. 5), représentant le signal du détecteur pour un même flux de soluté en fonction du débit d'hydrogène, nous avons observé que, pour un débit d'azote de 24 $cm^3$/mn dans la colonne, une variation de débit d'hydrogène de 30 à 18 $cm^3$/mn correspondait à une augmentation de hauteur de pic de 30 % ; cette observation nous a conduit à abandonner les générateurs d'hydrogène, beaucoup trop imprécis, et à les remplacer par des bouteilles de gaz comprimé à 150 kg/$cm^2$ ; nous détendons l'hydrogène à 1,800 kg/$cm^2$ grâce à un mano-détendeur de précision ; nous créons ensuite une perte de charge à l'aide d'un capillaire

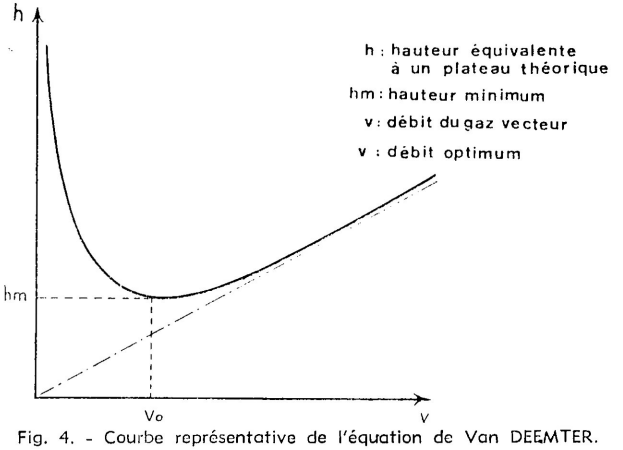



Fig. 4. - Courbe représentative de l'équation de Van DEEMTER.

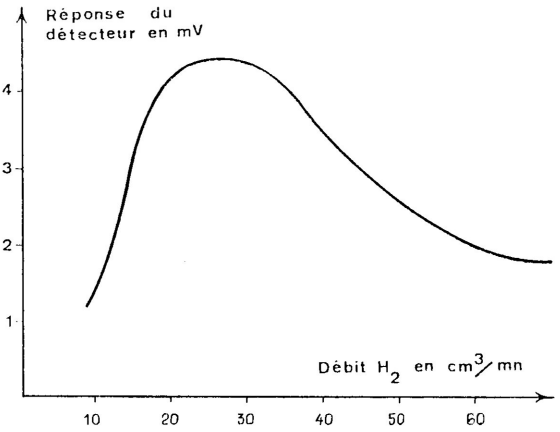



Fig. 5. - Courbe représentant l'influence du débit d'hydrogène sur la réponse du détecteur à inonisation de flamme pour un débit de gaz vecteur de 23 cm3 d'azote par mn.

et d'une vanne à pointeau « B 2 S » ; cet ensemble permet d'avoir un débit d'hydrogène remarquablement constant, dont la différence est inférieure à 0,5 $cm^3$ au bout de plusieurs mois. Le débit d'hydrogène optimum, pour les colonnes de 1/8 de pouce et pour ce type de détecteur, est voisin de 20 $cm^3/mn$.

Le débit d'air dans le détecteur est de 300 $cm^3/mn$ pour l'Aerograph 204 et de 400 $cm^3/mn$ pour l'Aerograph 1200. (Tous les débits sont mesurés grâce à un débitmètre à bulles de savon.)

La température de l'injecteur doit être suffisante pour volatiliser l'échantillon (170 °C dans notre cas). La température du détecteur ne doit pas être trop faible, car il y aurait risque de condensation des produits dans les capillaires reliant la sortie de la colonne au détecteur, mais elle ne doit pas non plus être trop élevée, car il y a alors perte de sensibilité.

Enfin, pour un bon fonctionnement, certaines parties de l'appareil doivent être parfaitement propres, des nettoyages fréquents de la chambre à injection et du détecteur sont nécessaires (au moins un par mois). Egalement, les réglages purement électroniques (zéro électrique de l'appareil et « balance ») doivent être réajustés quotidiennement.

Le réglage de l'enregistreur doit être fait comme suit : l' « amortissement » étant faible, on règle le « gain » de telle sorte que la plume, ayant été sollicitée par une traction manuelle, revienne immédiatement à sa position d'équilibre autour de laquelle elle doit osciller légèrement ; ces oscillations sont alors supprimées en augmentant l' « amortissement ».

Les appareils ainsi réglés sont prêts à fonctionner.

CHAPITRE III

# DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DU VIN PAR INJECTION DIRECTE

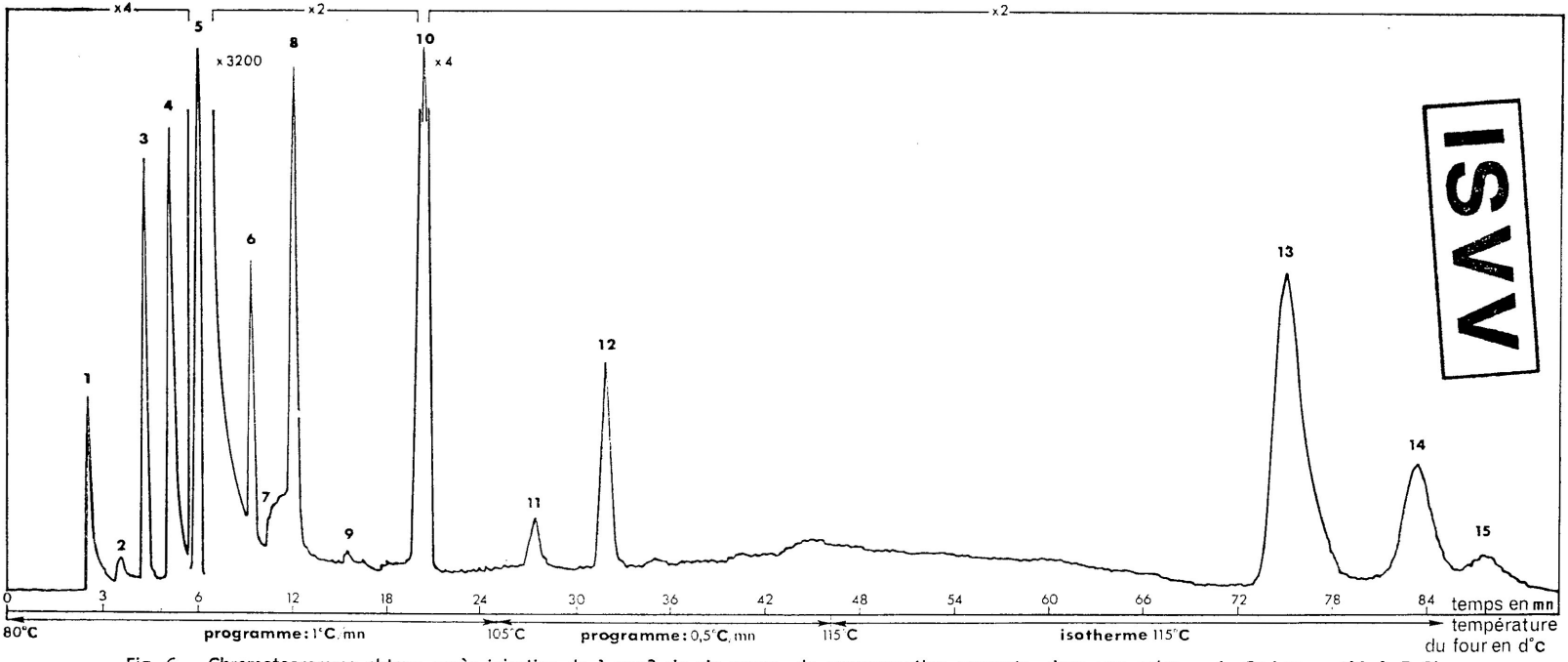
## 1° GENERALITES.

Comme nous l'avons déjà précisé, les perfectionnements des chromatographes les plus modernes permettent de doser les alcools supérieurs des spiritueux par injection directe dans l'appareil. C'est seulement lorsque nous avons disposé du chromatographe « Aerograph 1200 » que nous avons pu appliquer cette technique au vin ; en effet, le détecteur de cet appareil est particulièrement sensible et le bruit de fond est faible.

## 2° CONDITIONS OPERATOIRES.

Les substances volatiles que nous envisageons de doser par injection directe sont celles dont le point d'ébullition est inférieur à celui du méthyl-3 butanol-1 (131 °C) ; mais dans le vin il y a encore le lactate d'éthyle, l'hexanol, le phényl-2 éthanol, et certains acides volatils, dont la teneur est supérieure à 10 mg/l, donc à priori dosables par injection directe ; à titre d'exemple, SAPIS (115) a trouvé de 10 à 100 mg/l de phényl-2 éthanol dans le vin. Nous avons donc cherché à mettre ces substances en évidence en injectant le vin directement dans le chromatographe ; pour cela nous avons voulu utiliser des colonnes plus courtes que les colonnes de Carb. 1540 et C + H, précédemment citées, mais les résultats ont été assez décevants.

a) **Emploi des colonnes classiques en température programmée.** — Pour mettre en évidence les substances à poids moléculaire relativement élevé, nous avons donc envisagé l'emploi de colonnes C + H en température programmée de 80 à 115 °C ; le chromatogramme de la fig. 6 a été réalisé à sensibilité 4 jusqu'à la sortie de l'éthanol, qui a dû être réduit 3 200 fois, puis à sensibilité 2. La réalisation d'un tel chromatogramme pose néanmoins quelques problèmes ; la ligne de base n'est pas toujours suffisamment stable parce que la colonne vieillit plus vite en température programmée qu'en isotherme, même avec une colonne identique fonctionnant en opposition il est difficile d'avoir de bons résultats avec une sensibilité satisfaisante.




ISVV

Fig. 6. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 de vin rouge, de consommation courante, dans une colonne de Carbowax 400 à 5 % + Hallcomid M-18 OL à 1 % enrobant du Chromosorb W « 60-80 mesh » régénéré à 850 °C pendant 4 heures. Colonne en cuivre de 7,5 m x 3,2 mm. Température de l'injecteur : 180 °C. Température du détecteur : 180 °C. Débit d'azote dans la colonne : 20,5 cm3/mn. Débit d'air : 400 cm3/mn. Débit d'hydrogène dans le détecteur : 25 cm3/mn.

**Identification des pics** - 1 éthanal, 2. propanal + acétone + formiate d'éthyle + acétate de méthyle, 3. acétate d'éthyle, 4. méthanol, 5. éthanol, 6. propanol-1, 7. eau, 8. méthyl-2 propanol-1, 9. butanol-1, 10. méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1, 11. lactate d'éthyle, 12. hexanol-1, 13., 14. et 15. non identifiés.

b) **Emploi des colonnes semi-capillaires.** — Finalement nous avons obtenu des résultats supérieurs en utilisant une colonne capillaire à paroi interne tapissée par un support très fin imprégné de phase stationnaire ; on appelle de telles colonnes « Support coated open tubular ». Le tube en acier inoxydable a un diamètre intérieur de 0,5 mm et sa paroi interne est tapissée de « Chromosorb W » broyé, dont la granulométrie est supérieure à 180 mesh ; ce support est lui-même enrobé de Carbowax 400. Nous avons fabriqué cette colonne nous-même ; pour cela nous avons broyé du « Chromosorb W » dans de l'éthanol, à l'aide d'un mixer ; une fois séché, ce support a été retamisé sur tamis n° 19 (norme AFNOR), lavé plusieurs fois avec les acides nitrique et chlorhydrique concentrés puis avec du carbonate de soude et de l'eau, jusqu'à neutralité du milieu. Le support a été passé au four à 850 °C durant quatre heures et nous l'avons laissé refroidir dans un dessicateur sous vide. 0,2 g de ce support a été immergé dans 20 $cm^3$ de chlorure de méthylène, contenant 5 % de Carbowax 400 ; après avoir été homogénéisé, le mélange a été abandonné durant 5 mn et le dépôt qui est formé par les plus grosses fractions du support éliminé. Le surnageant est ensuite introduit dans le tube sous une pression de 5 $kg/cm^2$ fournie par une bouteille d'azote comprimé. Lorsque tout le liquide est ressorti de la colonne, nous continuons à faire circuler durant 30 mn un important courant d'azote de manière à éliminer les dernières traces de solvant.

La colonne ainsi préparée est branchée à l'intérieur du four ; elle nécessite, pour un bon fonctionnement, un débit de gaz vecteur de l'ordre de 1 à 5 $cm^3/mn$ ; ce débit étant faible, il convient de faire arriver 20 $cm^3$ d'azote supplémentaires dans l'hydrogène alimentant la flamme du détecteur, de manière à conserver à cette flamme une dimension conforme à la géométrie du détecteur pour ne pas perdre de sensibilité.

Une telle colonne, lorsqu'elle a été stabilisée, peut être chauffée à des températures assez élevées sans pour autant occasionner des modifications notables de la ligne de base.

Nous avons ainsi réalisé le chromatogramme de la fig. 7 en injectant 1 $mm^3$ de vin dans une telle colonne et en programmant la température du four de 35 à 105 °C. La séparation est d'une qualité exceptionnelle, très supérieure aux résultats obtenus avec tous les autres types de colonnes ; on peut considérer que tous les constituants volatils du vin, depuis le méthanol jusqu'au phényl-2 éthanol, sont séparés en une seule opération.

Cependant cette méthode présente encore de sérieux inconvénients : prix de revient élevé, difficulté de fabrication et surtout vieillissement très

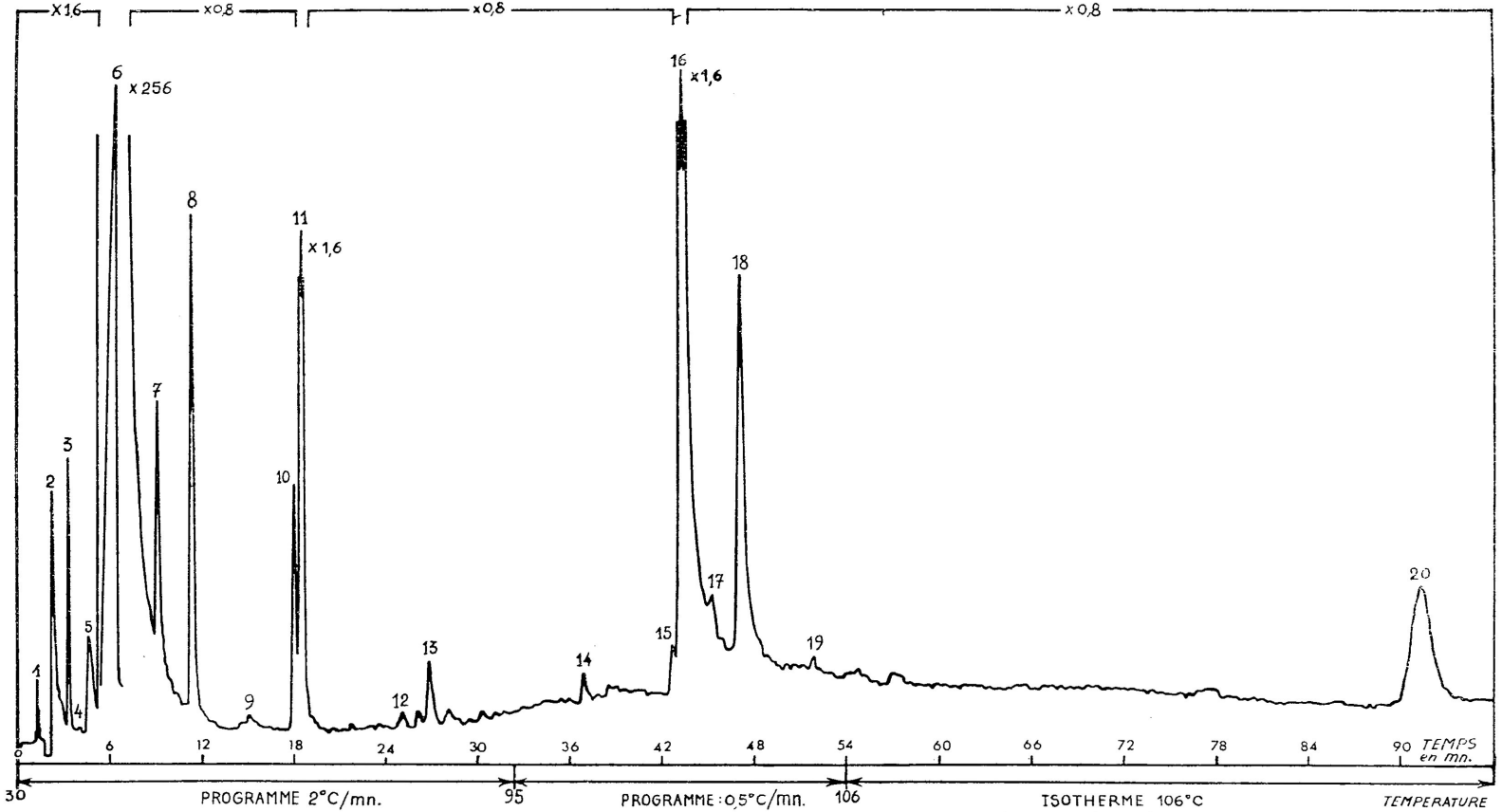



Fig. 7. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 de vin blanc « Traminer » dans une colonne capillaire à paroi interne tapissée par du Carbowax 400 enrobant du Chromosorb W " 180 mesh ", colonne en acier " inox " de 25 m x 0,5 mm (Ø int.). Température du détecteur : 180 °C. Débit d'azote dans la colonne : 3 cm3/mn. Débit d'hydrogène dans le détecteur : 25 cm3/mn, débit d'air : 300 cm3/mn.

**Identification des pics -** 1. air, 2. éthanal, 3. acétate d'éthyle, 4. acétal, 5. méthanol, 6. éthanol, 7. propanol-1, 8. méthyl-2 propanol-1, 9. butanol-1, 10. méthyl-2 butanol-1, 11. méthyl-3 butanol-1, 12. lactate d'éthyle, 13. hexanol-1, 14., 15., 16., 17., 18., 19. non identifiés, 20. phényl-2 éthanol.

rapide de la colonne qui entraîne une diminution du pouvoir de résolution ; au bout de 10 injections, le propanol-1 est à peine séparé de l'éthanol, bien que nous utilisions une précolonne de 2 cm de «Chromosorb W » destinée à retenir les substances non volatiles du vin qui détériorent la colonne.

Nous estimons cependant que, dans l'avenir, l'étude précise du vin par chromatographie se fera par une injection directe dans des colonnes capillaires ou semi-capillaires, placées dans des appareils encore plus sensibles.

c) **Emploi des colonnes classiques en isotherme.** — Quoiqu'il en soit, notre problème était d'étudier les substances les plus volatiles et non toutes les substances volatiles du vin ; aussi nous avons préféré injecter le vin dans une colonne classique (C + H ou Carb. 1540) placée dans un four à température constante, de telle sorte qu'en 40 mn nous séparons toutes les substances les plus volatiles présentes à une concentration supérieure à 10 mg/l ; les autres substances volatiles sortent dans ces conditions beaucoup plus loin et les pics aplatis ne gênent pas un nouveau chromatogramme qui vient éventuellement se superposer.

3° DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE.

Pour réaliser un chromatogramme de vin, nous injectons 1 $mm^3$ de vin à l'aide d'une microseringue Hamilton de 10 $mm^3$, équipée d'un adaptateur Chaney (701 N CH), permettant de délivrer toujours le même volume avec une erreur inférieure à 1 %. La colonne doit être d'une stabilité parfaite, car il est nécessaire d'opérer à sensibilité maximum. A titre d'exemple, nous avons reproduit (fig. 8) le chromatogramme représentant l'injection directe d'un vin autrichien « Jubileum » sur colonne Carb. 1540. Les pics sont suffisamment hauts pour être mesurables avec une bonne précision. Il est ainsi possible de doser l'éthanal, l'acétate d'éthyle, le méthanol, le propanol-1, le méthyl-2 propanol-1 et le mélange méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1. Néanmoins, en ce qui concerne le dosage de l'éthanal, nous avons rencontré des difficultés pour la conservation des solutions témoins et, en outre, la hauteur du pic varie en fonction de l'âge de la colonne (le pic traîne de plus en plus) ; nous pensons que le dosage chimique est actuellement plus précis : le dosage par chromatographie gazeuse pourrait peut-être se faire avec une meilleure précision après passage par l'oxime comme le propose ANDRE (103). Nous faisons toujours les dosages par série ; chaque série comporte en général de 10 à 15 vins ce qui correspond à deux jours de chromatographie ; après chaque série, nous injectons quatre solutions témoins,

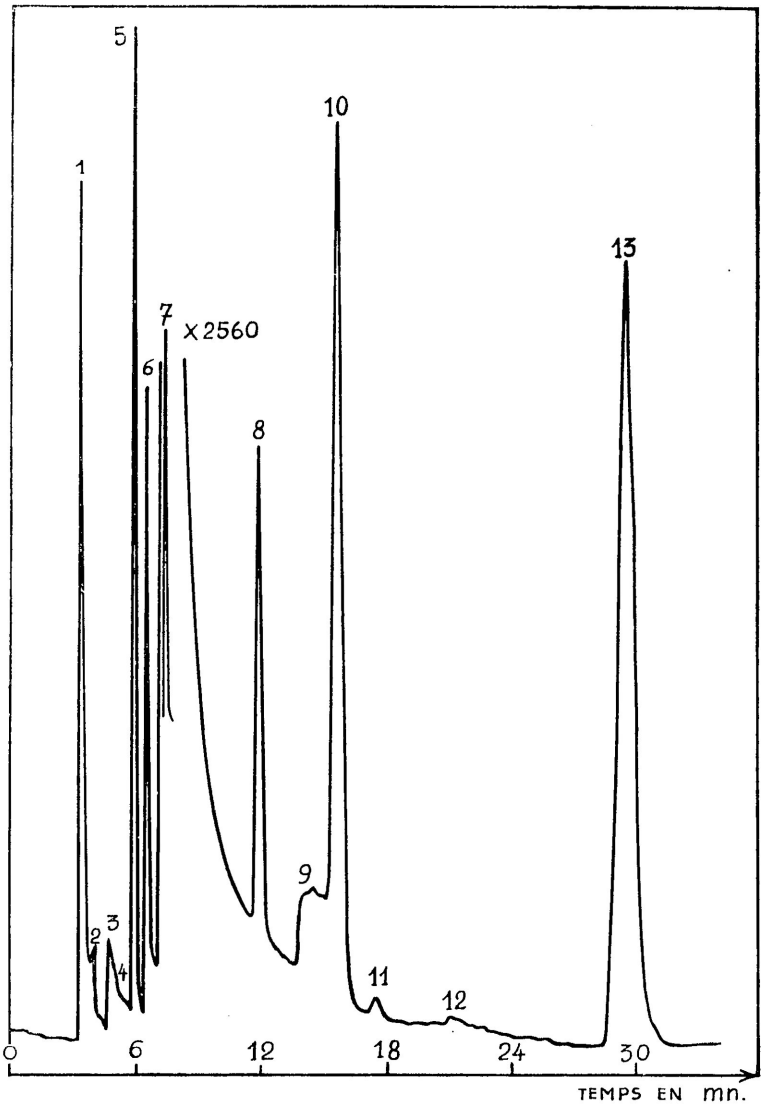



Fig. 8 - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 de vin autrichien "Jubileum" dans une colonne de Carbowax 1540 à 10 % enrobé sur Chromosorb W « 60-80 mesh » Colonne en cuivre de 7,5 m x 3,2 mm. Température du four : 90 °C. Température de l'injecteur 70° C. Température du détecteur 200° C. Débit d'azote dans la colonne : 25 cm3/mn. Débit d'hydrogène dans le détecteur : 20 cm3/mn. Débit d'air : 400 cm3/mn. Sensibilité : 2 x 1 sauf pour l'éthanol : 256 x 10.

**Identification des pics** - 1. éthanal, 2. inconnu, 3. propanal + acétone + formiate d'éthyle + acétate de méthyle, 4. inconnu, 5. acétate d'éthyle, 6. méthanol, 7. éthanol, 8. propanol-1, 9. eau, 10. méthyl-2 propanol-1, 11. acétate de méthyl-3 butyle, 12. butanol-1, 13. méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1.

contenant les mêmes composés volatils que le vin, préparées à partir d'une solution mère contenant elle-même pour 1 litre :

— 1,25 g d'acétate d'éthyle et de propanol-1 ;

— 2,5 g de méthanol ;

— 5 g de méthyl-2 propanol-1 ;

— 12,5 g du mélange de méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1 (23-77, v/v).

Les solutions témoins sont préparées en diluant la solution précédente au 1/100, 2/100, 4/100, 8/100. En mesurant les pics obtenus par injection de ces solutions, nous obtenons des gammes étalons et, si nous portons sur un graphique la hauteur des pics en fonction des concentrations nous

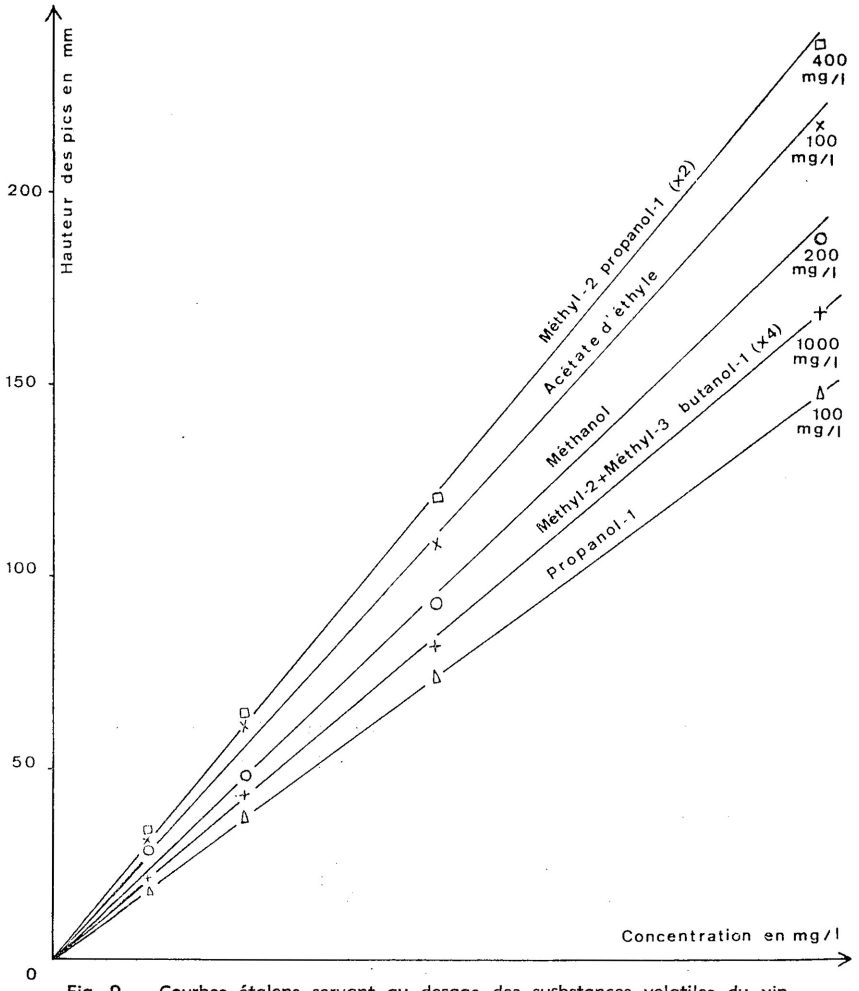



Fig. 9. - Courbes étalons servant au dosage des susbstances volatiles du vin, par injection directe.

obtenons toujours des droites (fig. 9). En rapportant à ces droites la hauteur des pics des substances à doser dans le vin, on détermine les concentrations correspondantes.

Nous avons ainsi dosé les substances volatiles d'une centaine de vins et d'une vingtaine de milieux synthétiques de fermentation, certains résultats seront discutés dans le chapitre VI.

4° REPRODUCTIBILITE DE L'INJECTION.

Nous avons voulu vérifier la reproductibilité du dosage, en faisant 10 chromatogrammes du même vin, la mesure des hauteurs de pics nous a permis de déterminer les concentrations des différentes substances et nous avons reproduit ces résultats dans le tableau I ; les fluctuations

TABLEAU I

**Etude de la reproductibilité de l'injection**

| | Quantités trouvées lors de 10 injections du même vin | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | Moyenne | Erreur relative % |
| Ethanal* ..... | 199 | 196 | 200 | 209 | 200 | 207 | 198 | 200 | 192 | 199 | 200 | 3,5 |
| Méthyl-2 propanal* .. | 46 | 43 | 45 | 43 | 46 | 46 | 46 | 48 | 46 | 45 | 45 | 4,5 |
| Acétate d'éthyle .... | 65 | 62 | 62,5 | 65 | 62,5 | 65 | 63 | 63 | 64 | 63 | 63,5 | 4,0 |
| Méthanol ..... | 56 | 57 | 57,5 | 57,5 | 59,5 | 56 | 56 | 58 | 56 | 58 | 57 | 4,4 |
| Ethanol* ..... | 224 | 222 | 224 | 221 | 226 | 230 | 228 | 228 | 227 | 226 | 225,5 | 1,3 |
| Propanol-1 ..... | 31 | 31 | 31 | 33 | 31 | 32 | 33 | 33 | 33 | 33 | 32 | 3,3 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 85 | 83 | 83 | 91 | 84 | 87,5 | 84 | 90 | 88 | 89 | 87 | 3,4 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 .. | 235 | 240 | 248 | 251 | 250 | 250 | 254 | 250 | 252 | 252 | 248 | 3,2 |

* L'éthanal et le méthyl-2 propanal sont exprimés en hauteurs de pics à sensibilité 2, car nous n'avons pas mis au point de méthode de dosage des aldéhydes; l'éthanol est à sensibilité 1600; les autres résultats représentent des mg/l.

sont faibles, de l'ordre de 3 %, et surtout dues à l'imprécision de la mesure du volume d'échantillon lors de l'injection ; néanmoins nous pouvons considérer que la précision est équivalente à celle du dosage chimique.

Nous avons ensuite vérifié que nous retrouvions bien des additions connues des différentes substances dont nous envisageons le dosage. Pour cela, nous avons rajouté dans 100 cm³ d'un vin, des quantités croissantes de 1 à 5 cm³ d'une solution mère contenant :

— 1,25 g/l d'acétate d'éthyle et de propanol-1 ;
— 2,5 g/l de méthanol ;
— 5 g/l de méthyl-2 propanol-1 ;
— 12,5 g/l du mélange de méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1 (1-3, v/v).

TABLEAU II

**Contrôle du dosage des substances volatiles du vin par injection directe**

| | | Volume de solution mère ajouté à 100 cm³ de vin | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + 1 cm³ | | + 2 cm³ | | + 3 cm³ | | + 4 cm³ | | + 5 cm³ | |
| | $C_i$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ |
| Acétate d'éthyle .... | 62 | 72 | 75 | 82 | 87 | 93 | 100 | 110 | 112 | 124 | 125 |
| Méthanol ..... | 58 | 80 | 83 | 100 | 108 | 124 | 133 | 150 | 150 | 175 | 175 |
| Propanol-1 ..... | 33 | 42,5 | 45 | 55 | 57 | 65 | 70 | 80 | 82,5 | 92 | 95 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 88 | 135 | 138 | 183 | 188 | 238 | 238 | 292 | 288 | 344 | 350 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 .. | 248 | 375 | 273 | 512 | 498 | 625 | 625 | 744 | 750 | 870 | 875 |

$C_i$ : concentration initiale ; $C_m$ : concentration mesurée ; $C_t$ : concentration théorique. Les résultats sont exprimés en mg/l.

Ces différents mélanges ont été chromatographiés ; les résultats reproduits dans le tableau II montrent une correspondance satisfaisante entre les concentrations théoriques et expérimentales.

5° VERIFICATION CHIMIQUE DU DOSAGE DE L'ACETATE D'ETHYLE ET DU METHANOL.

A titre de vérification nous avons tenu à comparer les dosages chimique et chromatographique du méthanol et de l'acétate d'éthyle. Pour comparer les dosages d'acétate d'éthyle nous avons utilisé des solutions

contenant 10° d'alcool et 91 puis 182 mg/l d'acétate d'éthyle (100 et 200 $mm^3$) ; nous avons également étudié un vin dans lequel nous avons rajouté 91 et 182 mg/l d'acétate d'éthyle.

TABLEAU III

**Dosage chimique et chromatographique de l'acétate d'éthyle**

| Echantillons | Résultats théoriques | Dosage chimique | Dosage chromato-graphique |
|---|---|---|---|
| Solution synthétique 1 .. | 91 | 91 | 89 |
| Solution synthétique 2 .. | 182 | 181 | 180 |
| Vin ..... | | 104 | 109 |
| Vin + 91 mg/l ..... | 197 | 195 | 201 |
| Vin + 182 mg/l ..... | 288 | 285 | 288 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Les dosages chimiques, effectués par la méthode PEYNAUD (104), et chromatographiques ont été faits sur ces cinq milieux et nous avons rassemblé les résultats dans le tableau III ; nous constatons que les chiffres sont très voisins.

TABLEAU IV

**Dosage chimique et chromatographique du méthanol**

| Echantillons | Résultats théoriques | Dosage chimique | Dosage chromato-graphique |
|---|---|---|---|
| Vin ..... | | 133 | 133 |
| Vin + 50 mg/l ..... | 183 | 182 | 181 |
| Vin + 100 mg/l ..... | 233 | 226 | 229 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

En ce qui concerne le méthanol, nous avons comparé les deux méthodes de dosage (fig. 10), sur un vin dans lequel nous avons rajouté 50 et 100 mg/l de méthanol. Le dosage colorimétrique a été fait par la méthode de TAVERNIER et JACQUIN (105). Dans ce cas également, on observe une bonne correspondance entre les deux méthodes de dosage (tableau IV).

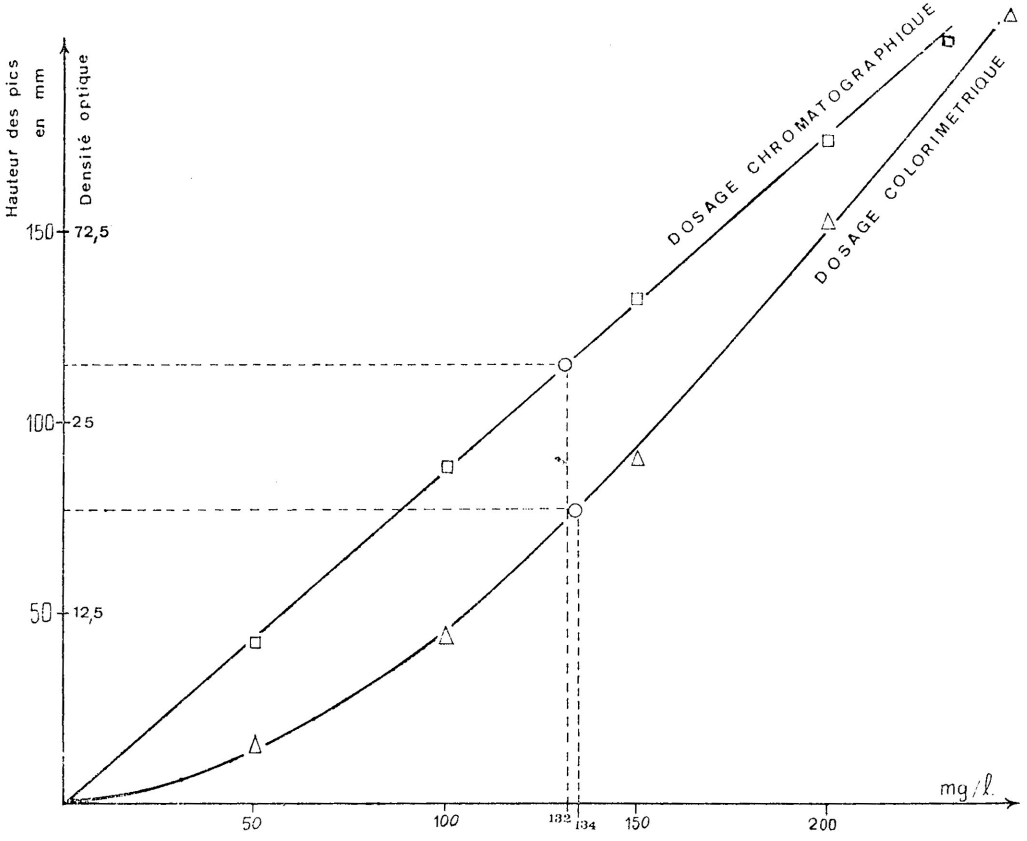



Fig. 10. - Dosage colorimétrique et chromatographique du méthanol.

CHAPITRE IV

# DESCRIPTION DE LA METHODE D'EXTRACTION

Il n'est pas possible d'expliquer ou de prétendre connaître l'arôme d'un vin par le seul dosage de ses alcools supérieurs ; il faut compléter cette étude par le dosage des substances présentes dans le vin à moins de 10 mg/l, pour cela une extraction est indispensable.

La méthode consiste à extraire les substances volatiles du vin par un courant d'azote ; les substances entraînées sont condensées dans des pièges réfrigérés (fig. 11). L'extrait, recueilli dans un petit tube se trouvant à la base du piège, peut ensuite être analysé par chromatographie en phase gazeuse.

## 1° DESCRIPTION DU MATERIEL.

Cette méthode a été mise au point à l'issue de longs tâtonnements pour obtenir une extraction reproductible permettant le dosage.

Le vin est placé dans un vase à extraction (b) de 1 litre (8 cm de diamètre et 45 cm de haut) qui se trouve dans un bain-marie thermostaté (a) dont la température est maintenue constante (25 °C) grâce à une résistance (g), couplée avec un thermomètre à contact (f) ; un agitateur magnétique (c) permet d'amener le vin uniformément à la température voulue avant l'extraction. Le gaz barboteur est de l'azote de qualité « R », du commerce ; il pénètre dans le vin grâce à un perforateur (d), constitué par une tête de « flacon laveur de Durand » qui, à l'aide d'un rodage approprié, s'adapte sur le vase à extraction, et dont le tube plongeur est terminé par un tube à gaz en verre fritté de diamètre 2 cm et de porosité « 5 ».

Le débit du gaz est réglé au moyen d'un bulle à bulle, fixé à la sortie du manodétendeur de la bouteille d'azote comprimé, et d'un robinet à pointeau ($R_1$). Ce débit est mesuré à l'aide d'un débimètre à bulles de savon, monté en série dans le circuit gazeux ; une colonne de « silicagel » retient les impuretés introduites dans le gaz par le savon.

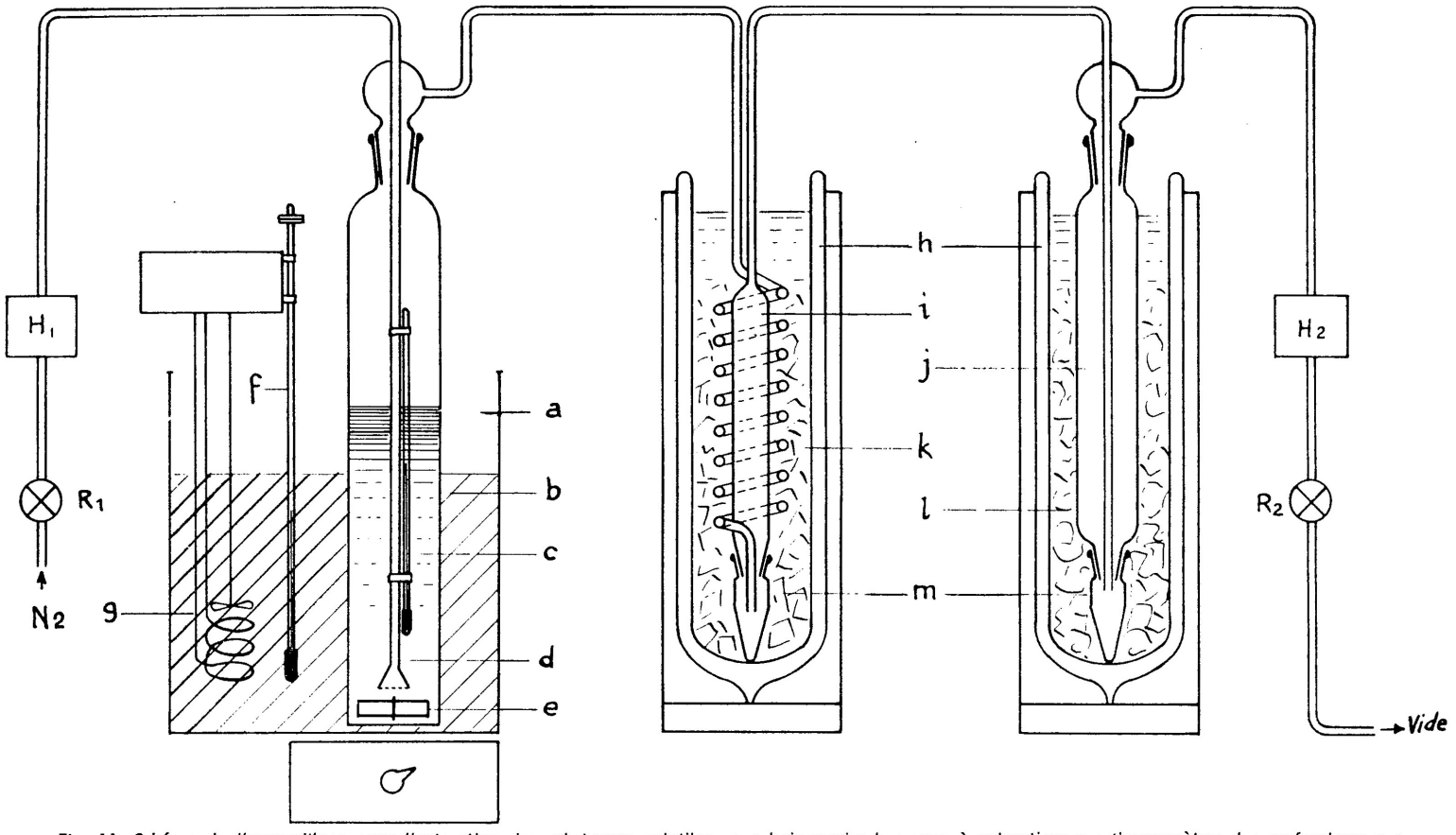



Fig. 11. Schéma de l'appareillage pour l'extraction des substances volatiles. a : bain-marie; b : vase à extraction; c : thermomètre; d : perforateur; e : agitateur magnétique; f : thermomètre à contact; g : résistance chauffante; h : vases DEWAR; i : piège à 0 °C; j : piège à - 80 °C; k : mélange eau + glace; l : mélange $CO_2$ solide + acétone; m : tubes rodés recueillant l'extrait; H1, H2 : manomètres à Hg; R1, R2 : robinets à pointeau.

La pression d'entrée du gaz est mesurée à l'aide d'un manomètre à mercure ($H_1$) ; cette pression doit être à peu près nulle pour un bon fonctionnement de l'appareil.

Les substances extraites par le courant gazeux sont condensées dans deux pièges réfrigérés. Le premier (i), long et de forme hélicoïdale, est placé dans un vase Dewar (h) contenant de la glace pilée et de l'eau ; il sert à recueillir l'eau entraînée par l'azote lors de l'extraction. Le second (j) est plus court et droit ; il est placé dans un vase Dewar contenant de la glace carbonique et de l'alcool (— 75 °C environ) ; ce piège récupère l'extrait que nous étudions par chromatographie en phase gazeuse.

Enfin l'ensemble fonctionne sous un vide partiel (30 cm Hg), destiné à favoriser l'extraction des substances volatiles du vin ; ce vide est fourni par une pompe à palettes et il est réglé par une vanne dont le pointeau est en « téflon » ; il est mesuré à l'aide d'un manomètre à mercure ($H_2$).

Au cours de notre expérimentation nous avons eu l'occasion de modifier les pièges utilisés. Au début nous avions un piège plongé dans de l'azote liquide ; nous l'avons supprimé car nous estimons que notre méthode a pour but de recueillir un extrait reproductible et représentatif du produit extrait, sans chercher à faire une extraction quantitative de toutes les substances volatiles. Nous avons attaché beaucoup d'importance au diamètre intérieur du tube interne du second piège (j) ; d'une part il ne doit pas être trop gros sinon il y a perte d'une assez grande quantité d'extrait sur les parois de ce dernier, d'autre part il ne doit pas non plus être trop fin sinon il risque de se boucher avec de l'extrait condensé ; son diamètre intérieur est 2 mm.

Enfin il est à noter la très grande commodité de récupération de l extrait qui est reçu dans le tube à rodage (m), à l'extrémité inférieure du piège ; lorsque l'extraction est terminée, l'extrait est conservé à — 20 °C directement dans le tube bouché par un bouchon à rodage pendant le temps nécessaire aux études chromatographiques.

## 2° ETUDE DES PARAMETRES DONT DEPEND L'EXTRACTION.

a) **Généralités.** — Cette méthode d'extraction dépend d'un certain nombre de paramètres dont les variations influent sur la composition de l'extrait : nature du gaz vecteur et son débit ; pression sous laquelle est faite l'extraction ; volume du vin extrait ; temps d'extraction ; température

d'extraction ; sel minéral pouvant éventuellement saturer le vin ; forme, nombre et température des pièges réfrigérés.

Nous avons étudié systématiquement tous ces paramètres dont certains sont sans grande influence et ont été fixés une fois pour toute :

— Le vide a été fixé à 31 cm Hg (hauteur du mercure dans le manomètre : 45 cm) et le débit gazeux à 150 $cm^3$ par mn ; dans ces conditions les bulles de gaz, produites par le perforateur, sont très fines et, pour un même volume de gaz, la surface de contact entre celui-ci et le vin est maximum. Ce débit n'étant pas trop important, il n'y a pas formation de mousse à la surface du vin extrait.

— La température a été fixée à 25 °C, car celle-ci est facile à obtenir et elle permet d'amener rapidement tous les échantillons à une même température. Celle-ci est suffisamment basse pour ne pas entraîner de modifications notables dans le vin à extraire.

— La forme et la température des pièges réfrigérés ont été déterminées empiriquement et modifiées jusqu'à l'obtention d'un extrait suffisamment volumineux et riche en substances autres que l'alcool éthylique.

— Le volume de vin extrait (300 $cm^3$) est suffisant pour avoir une quantité d'extrait exploitable et pour permettre de faire simultanément, sur une même bouteille (750 $cm^3$), les déterminations classiques : degré alcoolique, acidité totale, acidité volatile...

Nous nous sommes plus particulièrement attaché à l'étude de l'influence d'un sel saturant le vin, de la nature du gaz vecteur et du temps d'extraction.

b) **Influence de la saturation du vin par un sel minéral.** — Nous nous sommes inspiré de la technique d'analyse des « espaces de tête » préconisée par KEPNER et **al.** (5) pour l'analyse des échantillons de bière. La saturation du vin par un sel minéral, en diminuant la tension de la vapeur de l'eau, favorise l'extraction des autres substances. Nous avons donc extrait, par un courant d'azote, 300 $cm^3$ de vin et dans les mêmes conditions, la même quantité de ce vin ayant reçu 175 g de sulfate d'ammonium et un autre échantillon ayant reçu 55 g de chlorure de sodium ; ces quantités correspondent aux doses maximum qu'il est possible de faire dissoudre rapidement dans 300 $cm^3$ de vin.

Les extraits ont été chromatographiés sur colonnes ESD et C + H de manière à mettre en évidence la majorité des substances extraites ;

nous avons reporté la hauteur des principaux pics dans le tableau V. Il ressort de cette étude que l'extrait de vin saturé par du chlorure de sodium est plus riche que les autres ; nous avons donc rajouté ce sel dans le vin, avant extraction, pendant les premiers temps de notre étude. Par la suite, considérant que l'extraction n'était pas quantitative, même en présence de chlorure de sodium, nous avons préféré extraire le vin nature, de manière à ce que l'opération soit plus sûrement constante et reproductible.

TABLEAU V

**Comparaison des extractions par un courant d'azote en fonction des sels saturant le vin**

**Conditions :** extraction de 300 $cm^3$ de vin, saturé ou non par un sel minéral, par un courant d'azote, de 150 $cm^3$/mn, durée de l'extraction : 0 h 30

| | Colonne | Sensibilité | Vin | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Seul | + 55 g NaCl | + 175 g $(NH_4)_2$ $SO_4$ |
| Ethanal | C+H | 1 | 23 | 20 | 51 |
| Formiate d'éthyle | ESD | 1 | 78 | 85 | 73 |
| Acétate de méthyle | ESD | 1 | 20 | 46 | 105 |
| Acétate d'éthyle | C+H | 160 | 86 | 160 | 210 |
| Méthanol | C+H | 4 | 112 | 122 | 124 |
| Propionate d'éthyle | ESD | 2 | 106 | 202 | 184 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | ESD | 1 | 78 | 125 | 67 |
| Acétate de méthyl-2 propyle + butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 72 | 120 | 67 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 7 | 19 | 8 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 5 | 14 | 5 |
| Propanol-1 | C+H | 1 | 93 | 108 | 74 |
| Méthyl-2 propanol-1 | C+H | 4 | 150 | 163 | 108 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | C+H | 4 | 20 | 32 | 11 |
| Ester inconnu | ESD | 1 | 11 | 11 | 11 |
| Méthyl-2 butanol-1 | C+H | 4 | 70 | 52 | 20 |
| Méthyl-3 butanol-1 | C+H | 4 | 200 | 143 | 52 |
| Poids des extraits | | | 0,158 g | 0,139 g | 0,226 g |

Les résultats représentant des hauteurs de pics sont exprimés en mm.

c) **Influence du gaz vecteur.** — Afin de connaître l'effet éventuel de la nature du gaz vecteur, nous avons fait des extractions du même vin, dans les mêmes conditions de température, de pression et de débit, par trois gaz différents : azote, hélium, gaz carbonique. Les extraits ont été chromatographiés sur colonnes C + H et ESD ; la hauteur des principaux pics est reportée dans le tableau VI. Les résultats obtenus ne laissent pas apparaître une différence très nette ; ceci semble normal puisque le gaz vecteur doit être considéré comme un simple élément d'agitation du vin et d'entraînement des vapeurs dégagées lors de cette agitation. Pour des raisons économiques, et aussi de pureté du gaz, nous avons choisi l'azote « R ».

TABLEAU VI

**Comparaison des extractions en fonction des gaz vecteurs**

**Conditions :** extraction de 300 $cm^3$ de vin par un débit de 150 $cm^3$/mn de différents gaz, durée de l'extraction : 0 h 30.

| | Colonne | Sensibilité | Gaz vecteurs | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | $N_2$ | He | $CO_2$ |
| Ethanal | C+H | 1 | 45 | 46 | 55 |
| Formiate d'éthyle | ESD | 1 | 56 | 51 | 48 |
| Acétate de méthyle | ESD | 1 | 42 | 47 | 35 |
| Acétate d'éthyle | C+H | 80 | 203 | 206 | 190 |
| Méthanol | C+H | 4 | 135 | 119 | 128 |
| Propionate d'éthyle | ESD | 2 | 124 | 129 | 116 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | ESD | 1 | 89 | 91 | 84 |
| Acétate de méthyl-2 propyle + butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 85 | 84 | 79 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 16 | 16 | 16 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | ESD | 1 | 11 | 11 | 11 |
| Propanol-1 | C+H | 1 | 105 | 95 | 110 |
| Méthyl-2 propanol-1 | C+H | 4 | 168 | 158 | 176 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | C+H | 1 | 88 | 90 | 93 |
| Ester inconnu | ESD | 1 | 11 | 11 | 11 |
| Méthyl-2 butanol-1 | C+H | 4 | 70 | 65 | 77 |
| Méthyl-3 butanol-1 | C+H | 4 | 200 | 185 | 216 |
| Poids des extraits | | | 0,178 g | 0,151 g | 0,177 g |

Les résultats représentant des hauteurs de pics sont exprimés en mm.

d) **Influence du temps d'extraction.** — Différents échantillons du même vin ont été extraits durant des temps variables, afin d'étudier l'influence de ce facteur sur la concentration des substances volatiles de l'extrait. Nous avons extrait un vin durant 5 h, 2 h, 1 h, 30 mn dans les mêmes conditions de pression, de débit et de température ; les extraits ont été chromatographiés sur colonne C + H et ESD et les hauteurs des principaux pics portées dans le tableau VII ; parallèlement nous avons construit les diagrammes (fig. 12) représentant la hauteur des pics de quelques substances en fonction du temps d'extraction et nous avons reproduit quatre de ces courbes parmi les plus significatives. Ces résultats montrent que, pour la plupart des substances, 30 mn est le temps d'extraction donnant les meilleurs résultats ; un temps plus court donnerait peut-être des résultats

TABLEAU VII

**Comparaison des extractions en fonction de la durée de l'extraction**

**Conditions** : extraction de 300 $cm^3$ de vin par un courant d'azote de 150 $cm^3$/mn sensibilité de l'enregistreur : x 2 sauf indication contraire.

| | Colonne | Temps d'extraction | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 h 30 | 1 h | 2 h | 5 h |
| Formiate d'éthyle ... | ESD | 190×4 | 155×4 | 116×4 | 100×4 |
| Acétate de méthyle . | ESD | 72×1 | 66×1 | 61×1 | 36×1 |
| Acétate d'éthyle .... | C+H | 225×320 | 180×320 | 147×320 | 100×320 |
| Acétal ..... | C+H | 23×4 | 19×4 | 18×4 | 15×4 |
| Méthanol ..... | C+H | 160×8 | 165×8 | 163×8 | 160×8 |
| Propionate d'éthyle . | C+H | 140×16 | 217×8 | 164×8 | 140×4 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | ESD | 112×4 | 140 | 95 | 33 |
| Butyrate d'éthyle + Acétate de méthyl-2 propyle ..... | ESD | 53×4 | 77 | 55 | 23 |
| Propanol-1 ..... | C+H | 12 | 12 | 11 | 14 |
| Méthyl-2 propanol-1 + acétate de méthyl-3 butyle ..... | C+H | 110×4 | 202 | 105×4 | 118×4 |
| Ester inconnu ..... | C+H | 35 | 24 | 17 | 5 |
| Méthyl-2 butanol-1 .. | ESD | 60 | 52 | 43 | 35 |
| Méthyl-3 butanol-1 .. | ESD | 160 | 137 | 125 | 115 |
| Poids des extraits .. | | 0,131 g | 0,295 g | 0,498 g | 1,400 g |

Les résultats représentant des hauteurs de pics sont exprimés en mm.

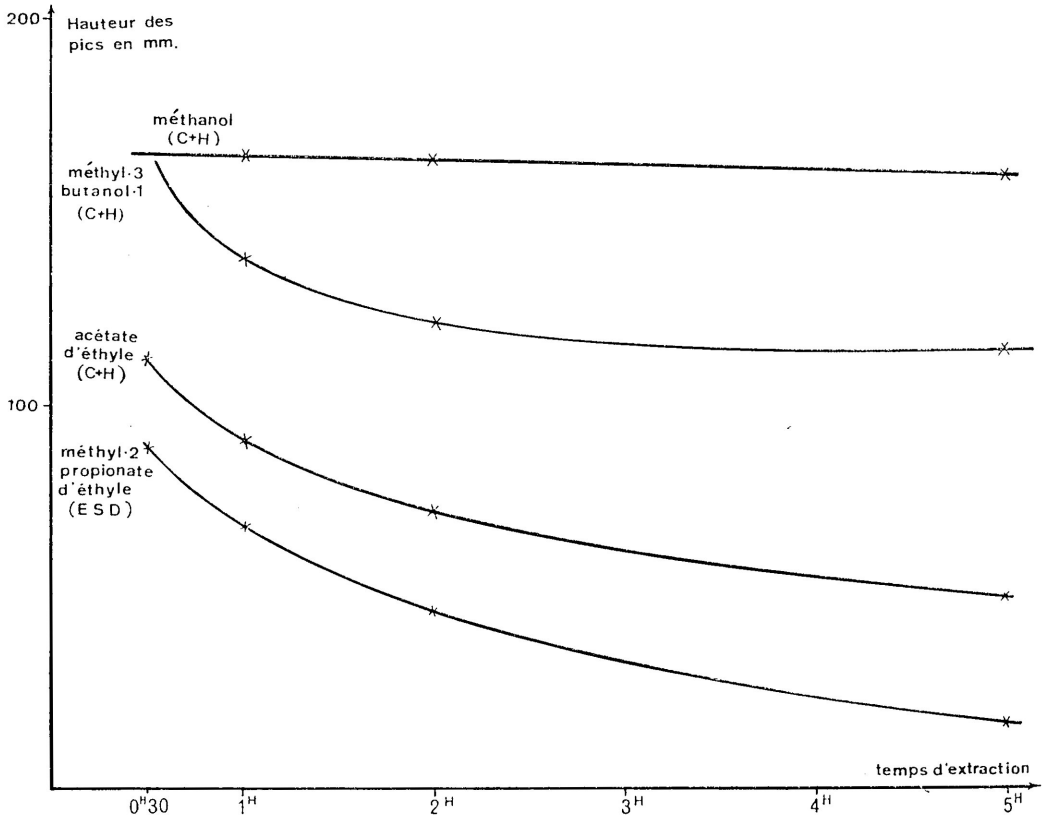



Fig. 12. - Influence du temps d'extraction sur la hauteur des pics

encore plus intéressants, mais le volume extrait deviendrait très faible et il serait alors difficile de récupérer quantitativement l'extrait. Il semble que la plupart des substances volatiles soient extraites au début de l'opération et qu'ensuite l'éthanol dilue ces substances ; ceci résulte de la considération du poids des extraits (constitués d'éthanol à 80 %) qui est à peu près proportionnel au temps d'extraction, alors que la concentration relative des substances décroît.

## 3° RESULTATS.

a) **Identification des substances de l'extrait.** — Nous avons réalisé les chromatogrammes de la fig. 13 par injection de 1 $mm^3$ d'extrait par l'azote d'un vin vieux (1962) de Saint-Emilion. Les identifications des pics

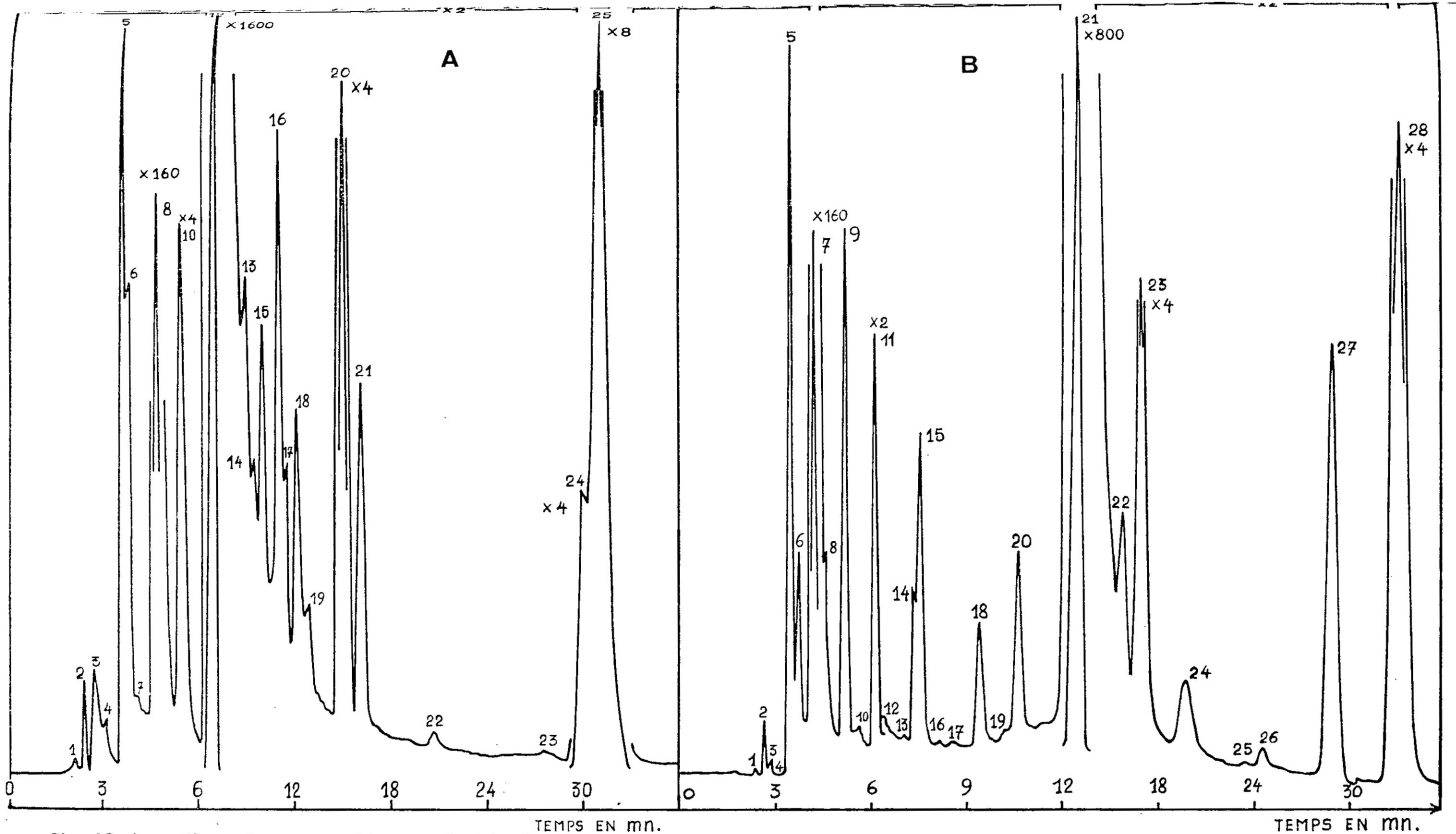



Fig. 13 A. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 d'extrait par l'azote, d'un vin rouge (Saint-Emilion 1962), dans une **colonne C + H.** Température de la colonne : 80 °C, température de l'injecteur : 180 °C, température du détecteur : 180 °C, débit d'azote dans la colonne : 20 cm3/mn, débit d'hydrogène dans le détecteur : 20 cm3/mn, débit d'air : 300 cm3/mn.
**Identification des pics. -** 1. éther éthylique, 2. inconnu, 3. éthanal, 4. propanal, 5. formiate d'éthyle, 6. acétate de méthyle, 7. acétone + méthyl-2 propanal, 8. acétate d'éthyle, 9. acétal, 10. méthanol + méthyl-3 butanal, 11. propionate d'éthyle, 12. éthanol, 13. acétate de méthyl-2 propyle, 14. inconnu, 15. butyrate d'éthyle, 16. propanol-1, 17. méthyl-2 butyrate d'éthyle, 18. méthyl-3 butyrate d'éthyle, 19. eau, 20. méthyl-2 propanol-1, 21. acétate de méthyl-3 butyle, 22. butanol-1, 23. inconnu, 24. méthyl-2 butanol-1 + ester inconnu, 25. méthyl-3 butanol-1.

Fig. 13 B. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 d'extrait par l'azote d'un vin rouge (Saint-Emilion 1962), dans une **colonne ESD.** Température de la colonne : 80 °C, température de l'injecteur : 180 °C, température du détecteur : 180 °C, débit d'azote dans la colonne : 25 cm3/mn, débit d'hydrogène dans le détecteur : 20 cm3/mn, débit d'air : 300 cm3/mn.
**Identification des pics. -** 1 et 2. inconnus, 3. éther éthylique, 4. formiate de méthyle, 5. formiate d'éthyle, 6. acétate de méthyle, 7. acétate d'éthyle + éthanal + propanal, 8. acétone + méthyl-2 propanal, 9. propionate d'éthyle + acétal + méthyl-3 butanal, 10. acétate de propyle, 11. méthyl-2 propionate d'éthyle, 12. inconnu, 13. méthyl-3 butyrate de méthyle, 14. acétate de méthyl-2 propyle, 15. butyrate d'éthyle, 16. inconnu, 17. acétate de butyle, 18. méthyl-2 butyrate d'éthyle, 19. inconnu, 20. méthyl-2 butyrate d'éthyle, 21. acétate de méthyl-3 butyle + éthanol + méthanol, 22. propanol-1, 23. méthyl-2 propanol-1, 24. ester inconnu, 25. inconnu, 26. butanol-1, 27. méthyl-2 butanol-1, 28. méthyl-3 butanol-1.

TABLEAU VIII

**Temps de rétention relatif au méthyl-2 propanol-1, des substances volatiles extraites du vin par un courant d'azote, pour différentes colonnes.**

| | E.S.D. | HALL. | N.P.G.A. | CARB. 400 |
|---|---|---|---|---|
| Ether éthylique | 0.151 | 0.078 | 0.136 | 0.093 |
| Ethanal | 0.232 | 0.060 | 0.163 | 0.125 |
| Méthyl-2 propanal | 0.256 | | 0.340 | 0.145 |
| Méthyl-3 butanal | 0.298 | 0.268 | 0.485 | 0.303 |
| Hexanal | 0.590 | | | |
| Acétal | 0.300 | 0.392 | | 0.245 |
| Acétone | 0.257 | 0.130 | | 0.208 |
| Formiate de méthyle | 0.180 | 0.070 | 0.186 | 0.138 |
| Formiate d'éthyle | 0.196 | 0.120 | 0.278 | 0.189 |
| Acétate de méthyle | 0.204 | 0.120 | 0.278 | 0.199 |
| Acétate d'éthyle | 0.241 | 0.202 | 0.376 | 0.255 |
| Propionate d'éthyle | 0.300 | 0.268 | 0.627 | 0.303 |
| Acétate de propyle | 0.330 | 0.268 | 0.693 | 0.307 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | 0.364 | 0.523 | 0.707 | 0.370 |
| Méthyl-3 butyrate de méthyle | 0.396 | | | |
| Acétate de méthyl-2 propyle | 0.440 | 0.651 | 0.890 | 0.455 |
| Butyrate d'éthyle | 0.446 | 0.651 | 1.080 | 0.543 |
| Formiate de méthyl-3 butyle | 0.485 | | | |
| Acétate de butyle | 0.515 | 1 | 1 | 0.588 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0.630 | 1.166 | 1.435 | 0.772 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0.660 | 1.166 | 1.435 | 0.772 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0.810 | 1.460 | 1.960 | 1 |
| Hexanoate d'éthyle | 1.530 | | | 1.773 |
| Ethanol | 0.775 | 0.174 | 0.362 | 0.830 |
| Méthanol | 0.715 | 0.268 | 0.362 | 0.455 |
| Propanol-1 | 0.895 | 0.585 | 0.627 | 0.900 |
| Méthyl-2 propanol-1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Méthyl-3 butanol-2 | 1.070 | 1.063 | 1.195 | 1.175 |
| Butanol-1 | 1.142 | 1.370 | 1.413 | 1.441 |
| Méthyl-2 butanol-1 | 1.780 | 2.462 | 2.190 | 2.010 |
| Méthyl-3 butanol-1 | 2.050 | 2.462 | 2.190 | 2.085 |

ont été faites sur plusieurs colonnes différentes et nous avons porté dans le tableau VIII les temps de rétention des différentes substances

relatifs à celui du méthyl-2 propanol-1. Dans le tableau IX se trouvent ies substances volatiles que nous avons identifiées dans le vin à l'aide de cette méthode. Sauf l'éther éthylique et le formiate de méthyle, tous les corps cités dans ce tableau avaient déjà été signalés dans le vin par de nombreux auteurs.

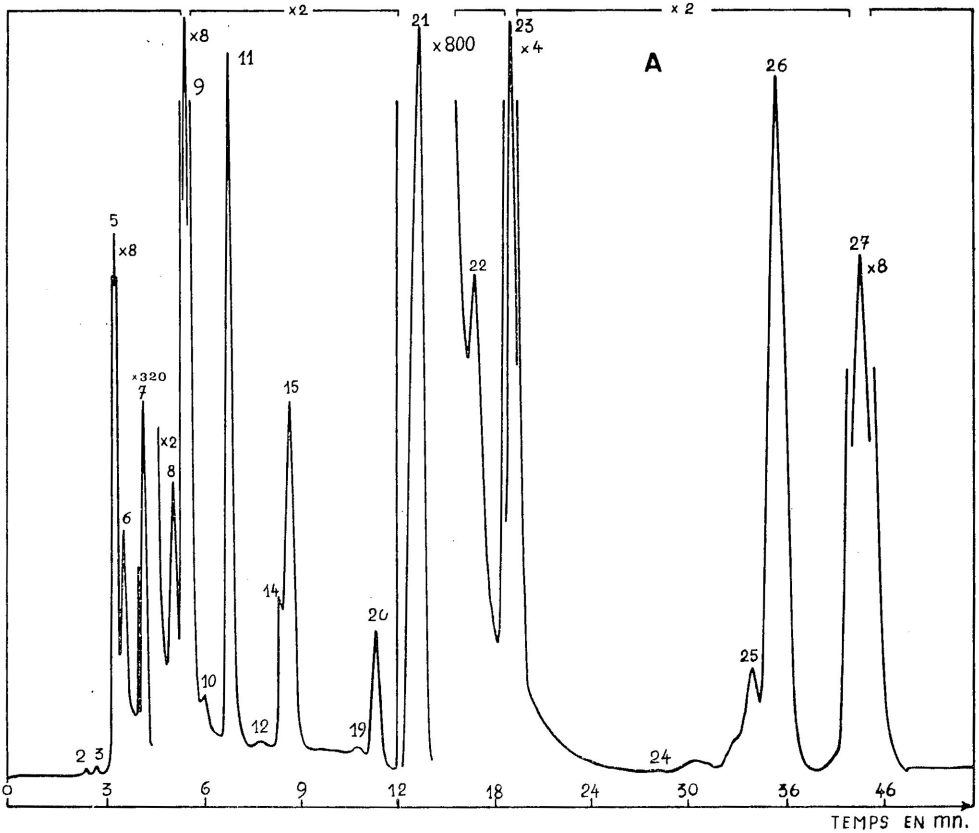
Cette méthode d'extraction se faisant à froid et sans le concours d'aucun agent chimique, il en résulte que les substances identifiées ne peuvent être ni des artefacts ni des impuretés de réactifs.

TABLEAU IX

| ALCOOLS | DIVERS | ALDEHYDES |
|---|---|---|
| Méthanol | Ether éthylique | Ethanal |
| Ethanol | Acétal | Propanal |
| Propanol-1 | Acétone | Méthyl-2 propanal |
| Butanol-2* | | Méthyl-3 propanal |
| Méthyl-2 propanol-1 | | Hexanal |
| Butanol-1 | | |
| Méthyl-2 butanol-1 | | |
| Méthyl-3 butanol-1 | | |
| **ESTERS** | | |
| Formiate de méthyle | Acétate de méthyl-2 propyle | Méthyl-2 propionate d'éthyle |
| Formiate d'éthyle | Acétate de méthyl-2 butyle | Butyrate d'éthyle |
| Acétate de méthyle | Acétate de méthyl-3 butyle | Méthyl-2 butyrate d'éthyle |
| Acétate d'éthyle | Acétate d'hexyle | Méthyl-3 butyrate d'éthyle |
| Acétate de propyle | Propionate d'éthyle | Hexanoate d'éthyle |

* Butanol-2 : présence occasionnelle.

b) **Mise en évidence des esters de l'extrait.** — Nous avons confirmé l'identification des esters en effectuant leur saponification. 300 cm³ de vin



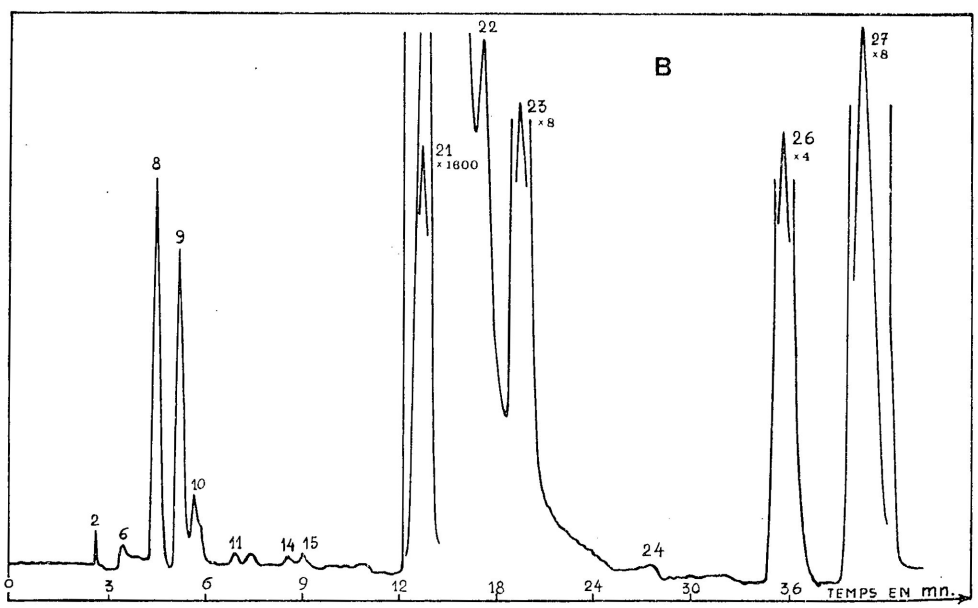




Fig. 14 A. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 de l'extrait par l'azote d'un **vin rouge,** dans une colonne ESD. Température du four : 65 °C, température de l'injecteur : 190 °C, température du détecteur 180° C, , débit d'azote dans la colonne : 20 cm3/mn, débit d'hydrogène dans le détecteur : 20 cm3/mn, débit d'air 300 cm3/mn.

**Identification des pics.** - 2. éther éthylique, 3. formiate de méthyle, 5. formiate d'éthyle, 6. acétate de méthyle, 7. acétate d'éthyle + éthanal + propanal, 8. acétone + méthyl-2 propanal, 9. acétal + propionate d'éthyle + méthyl-3 butanal, 10. acétate de propyle + inconnu, 11. méthyl-2 propionate d'éthyle, 12. méthyl-3 butyrate de méthyle, 14. acétate de méthyl-2 propyle, 15. butyrate d'éthyle, 19. acétate de butyle, 20. méthyl-2 butyrate d'éthyle, 21. éthanol + méthanol, 22. propanol-1, 23. méthyl-2 propanol-1, 24. butanol-1, 25. ester inconnu, 26, méthyl-2 butanol-1, 27. méthyl-3 butanol-1.

Fig. 14 B. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 de l'extrait par l'azote d'un **vin rouge saponifié,** dans une colonne ESD. Conditions opératoires et indentification des pics : voir Fig. 14 A.

sont maintenus à pH 12,3 durant vingt quatre heures à 40 °C ; le vin a ensuite été extrait de la même manière qu'il l'avait été avant saponification. Les chromatogrammes des deux extraits (fig. 14) montrent que les pics correspondant aux esters ont disparu, par contre ceux correspondant aux alcools et aux autres composants insaponifiables restent présents.

Il est évident que cette méthode d'extraction est surtout valable pour les esters puisque leur concentration augmente plusieurs centaines de fois dans l'extrait (comme nous le verrons par la suite), alors que celle des alcools n'augmente qu'une dizaine de fois.

c) **Comparaison des extractions par l'azote et par le pentane.** — Nous avons voulu comparer cette méthode avec celle mise au point par BOIDRON (1) qui est une extraction du type « liquide-liquide » de 1,5 l de vin par du pentane, en continu durant 240 heures ; le pentane ayant extrait le vin est séché sur du sulfate de magnésium puis distillé lentement ; le résidu de la distillation constitue l'extrait du vin et représente environ 0,5 $cm^3$. Nous avons comparé les substances présentes sur les chromatogrammes des extraits du même vin par le pentane et par l'azote (fig. 15) ; il s'agit d'une comparaison qualitative qui nous permet néanmoins de formuler quelques conclusions :

— L'extrait par le pentane est beaucoup plus riche que l'extrait par l'azote, en particulier en substances sortant après l'éthanol (pic n° 22) ; ceci est normal puisqu'il s'agit de substances relativement peu volatiles, donc moins bien extraites par l'azote.

— L'extrait par le pentane est très riche en méthyl-2 butanol-1 et en méthyl-3 butanol-1 (pics n° 27 et 28), par contre le méthyl-2 propanol-1 est moins bien extrait, ce qui fait que le rapport de ces alcools est très différent de celui qui préexistait dans le vin.

— L'extrait par le pentane possède au moins toutes les substances présentes dans l'extrait par l'azote. Du point de vue qualitatif, cette extraction semblerait donc plus intéressante, sauf peut-être pour les premiers pics, masqués par le solvant et ses impuretés.

Néanmoins l'extraction par l'azote présente deux avantages : c'est une méthode rapide et elle est parfaitement reproductible, comme nous le montrerons dans le chapitre suivant ; elle est donc bien adaptée à l'étude de nombreux échantillons et elle permet le dosage simultané d'un certain nombre d'esters et d'alcools volatils.

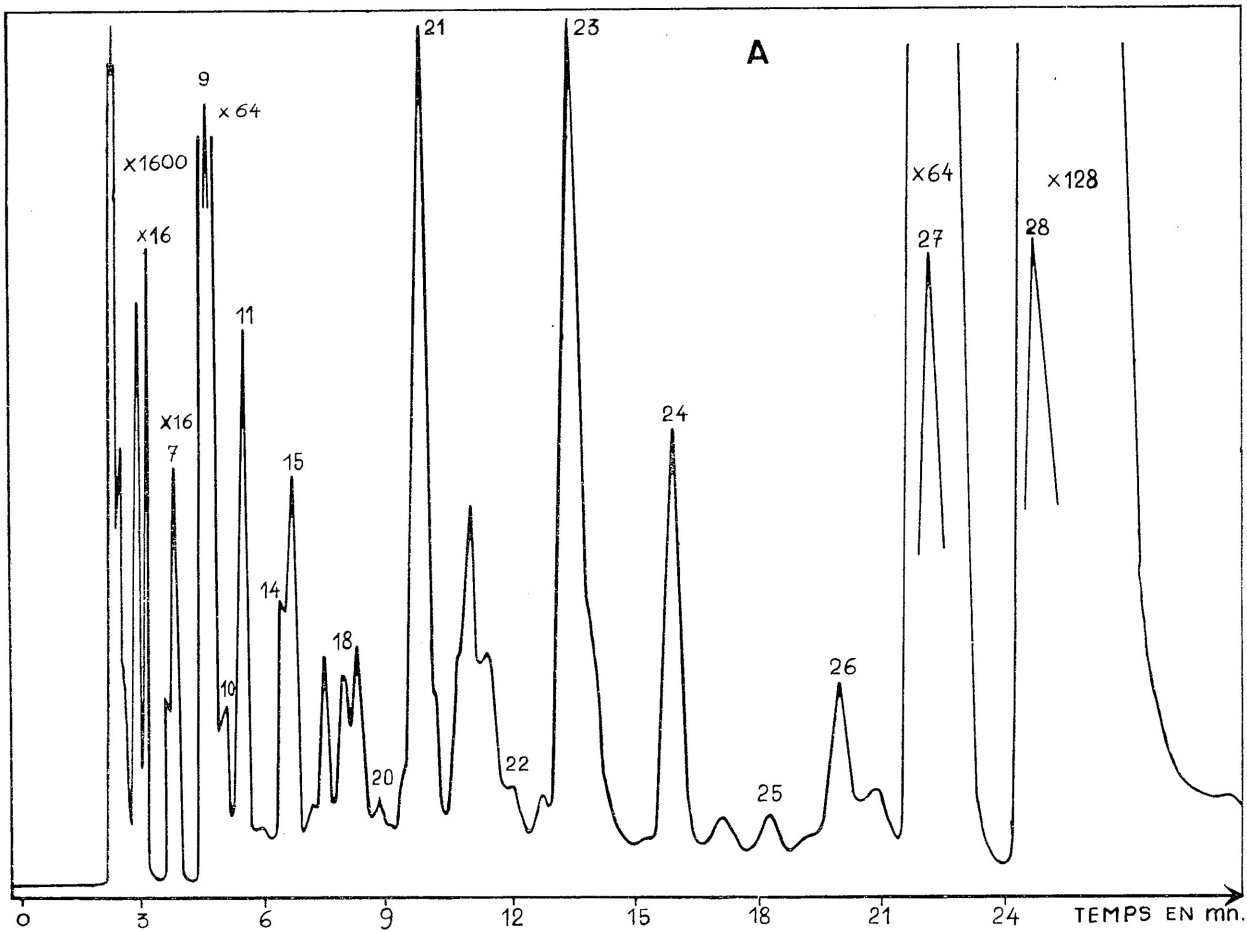



Fig. 15 A. - Chromatogramme obtenu après injection de 0,2 mm3 d'extrait d'un vin rouge **par le pentane** dans une colonne ESD. Température du four : 82 °C. Température de l'injecteur : 170 ° C, température du détecteur : 200 °C, débit d'azote dans la colonne : 25 cm3/mn, débit d'hydrogène dans le détecteur : 22 cm3/mn, débit d'air : 300 cm3/mn.
**Identification des pics -** 1 et 2. inconnus, 3. éther éthylique, 4. formiate de méthyle, 5. formiate d'éthyle, 6. acétate de méthyle, 7. acétate d'éthyle, 8. acétone + méthyl-2 propanal, 9. propionate d'éthyle + acétal + méthyl-3 butanal, 10. acétate de propyle, 11. méthyl-2 propionate d'éthyle, 14. acétate de méthyl-3 propyle, 15. butyrate d'éthyle, 16 et 17. inconnus, 18. acétate de butyle, 20. méthyl-2 butyrate d'éthyle, 21. éthanol, 22. propanol-1, 23. méthyl-2 propanol-1, 24. inconnu, 25. hexanoate d'éthyle + butanol-1, 26. inconnu, 27. méthyl-2 butanol-1, 28. méthyl-3 butanol-1.

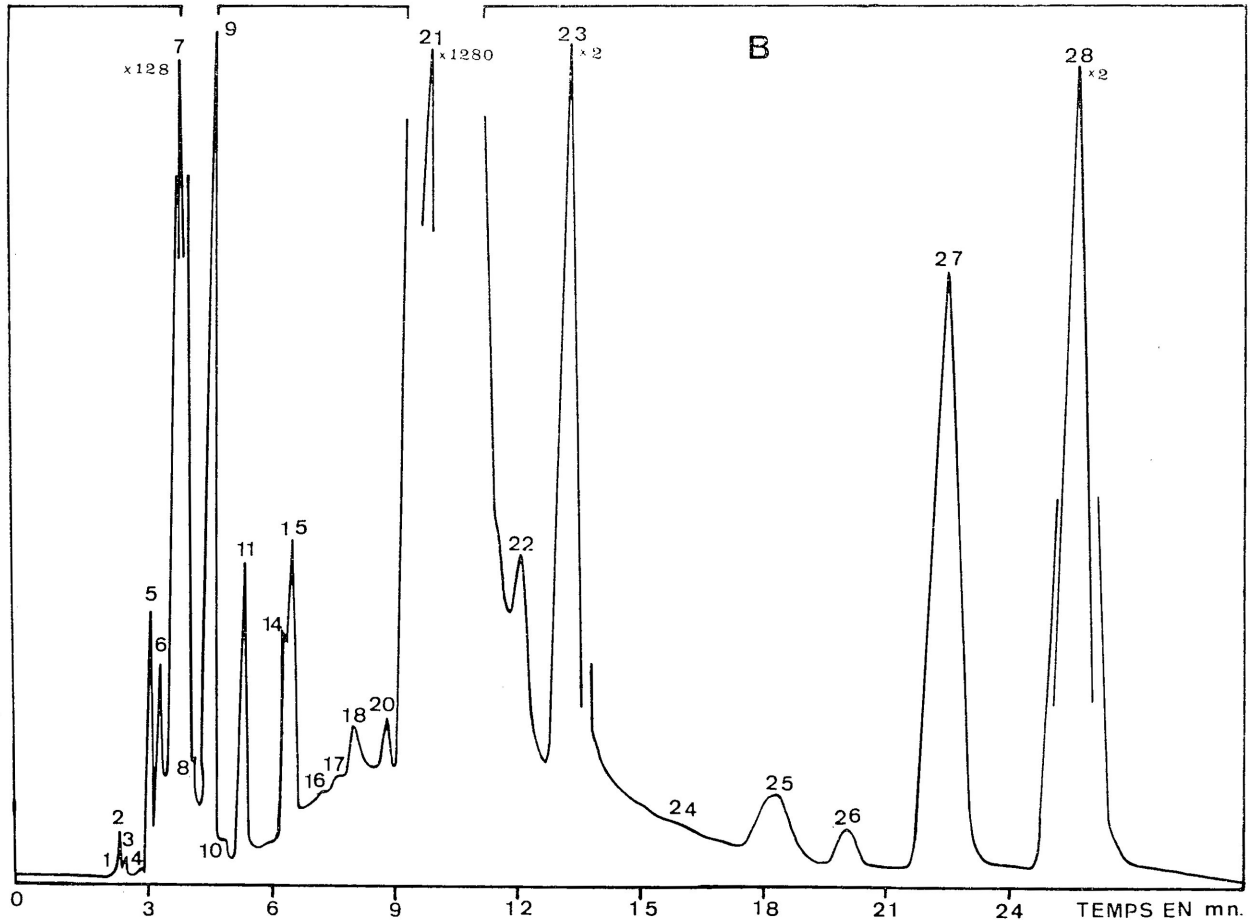



Fig. 15 B. - Chromatogramme obtenu après injection de 1 mm3 d'extrait de vin rouge **par l'azote,** dans une colonne ESD. Conditions opératoires et identification des pics : voir Fig. 15 A.

CHAPITRE V

# DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DU VIN APRES EXTRACTION

## 1° REPRODUCTIBILITE DE L'EXTRACTION.

Afin de vérifier si, au cours d'une série d'expériences, l'extraction est parfaitement reproductible, nous avons extrait 10 échantillons d'un même vin dans les conditions préalablement fixées : 300 $cm^3$ de vin sont extraits durant trente minutes par un courant d'azote de 150 $cm^3$ par minute ; l'extrait recueilli dans le piège à − 75 °C est chromatographié sur les colonnes ESD et C + H ; la hauteur des pics des chromatogrammes est reportée dans le tableau X qui indique également l'erreur relative commise sur la détermination de chacun des constituants. Il ressort de l'interprétation de ces chiffres que la précision obtenue est tout à fait satisfaisante, compte tenu des erreurs purement chromatographiques, dues surtout à la mesure du volume injecté, qui sont de 2 à 3 % ; mis à part les constituants très volatils et quelques autres corps dont les pics sortent en épaulement d'autres pics, l'erreur commise, dans ces conditions, dépend plus des conditions d'analyse chromatographique que de l'extraction elle-même.

## 2° INFLUENCE DU DEGRE ALCOOLIQUE SUR LA COMPOSITION DE L'EXTRAIT.

Afin d'étudier l'influence du degré alcoolique du produit analysé sur la composition de l'extrait, nous avons réalisé l'expérience suivante : des échantillons de 300 $cm^3$ du même vin sont portés à des degrés alcooliques différents par addition de solutions hydroalcooliques, le volume final est dans tous les cas de 400 $cm^3$ et les degrés des différents échantillons sont : 9°, 10°, 11°, 12° et 13°.

Ces échantillons, ne différant entre eux que par le degré alcoolique, sont extraits par un courant d'azote de 150 $cm^3$ par minute, durant trente

TABLEAU X

**Etude de la reproductibilité de l'extraction par l'azote**

**Conditions :** extraction de 10 échantillons de 300 $cm^3$ d'un même vin, par courant d'azote de 150 $cm^3$/mn, durée de l'extraction : 0 h 30.

| | Colonne | Sensibilité | Hauteurs des pics, en mm, représentant les 10 extractions | | | | | | | | | | Erreur relative % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| Ethanal ..... | C+H | 4 | 30 | 33 | 33 | 35 | 33 | 36 | 35 | 36 | 37 | 36 | 10 |
| Formiate d'éthyle ... | ESD | 4 | 37 | 35 | 31 | 33 | 30 | 36 | 30 | 34 | 35 | 32 | 10 |
| Acétate de méthyle . | ESD | 4 | 108 | 107 | 101 | 108 | 105 | 113 | 100 | 109 | 115 | 107 | 7,0 |
| Acétate d'éthyle .... | ESD | 512 | 226 | 227 | 226 | 232 | 232 | 231 | 226 | 232 | 235 | 234 | 2,0 |
| Propionate d'éthyle . | ESD | 8 | 210 | 210 | 210 | 219 | 220 | 214 | 217 | 218 | 220 | 223 | 3,0 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | ESD | 4 | 192 | 191 | 188 | 201 | 195 | 186 | 198 | 190 | 197 | 191 | 4,0 |
| Butyrate d'éthyle ... | C+H | 4 | 75 | 73 | 74 | 79 | 74 | 73 | 76 | 75 | 73 | 79 | 4,3 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle ..... | ESD | 4 | 32 | 32 | 32 | 34 | 33 | 32 | 32 | 31 | 33 | 32 | 4,7 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle ..... | ESD | 4 | 28 | 27 | 26 | 28 | 28 | 26 | 26 | 27 | 28 | 27 | 3,7 |
| Acétate de méthyl-3 butyle ..... | C+H | 4 | 68 | 62 | 61 | 60 | 61 | 60 | 60 | 66 | 69 | 63 | 8,3 |
| Ester inconnu ..... | ESD | 8 | 29 | 32 | 33 | 32 | 33 | 30 | 33 | 31 | 30 | 30 | 6,7 |
| Méthanol ..... | C+H | 16 | 212 | 205 | 212 | 211 | 209 | 208 | 208 | 205 | 204 | 208 | 3,2 |
| Propanol-1 ..... | C+H | 4 | 132 | 129 | 132 | 129 | 127 | 127 | 130 | 126 | 125 | 131 | 2,7 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | C+H | 16 | 188 | 184 | 189 | 190 | 188 | 185 | 194 | 190 | 184 | 191 | 2,7 |
| Méthyl-2 butanol-1 .. | C+H | 16 | 65 | 66 | 66 | 67 | 67 | 65 | 67 | 66 | 64 | 68 | 3,0 |
| Méthyl-3 butanol-1 .. | C+H | 16 | 202 | 207 | 206 | 210 | 211 | 204 | 217 | 210 | 202 | 213 | 3,3 |

minutes, suivant la technique habituelle ; les extraits sont chromatographiés à l'aide des colonnes ESD et C + H et la hauteur des pics correspondant aux principales substances portée dans le tableau XI ; nous avons tracé les courbes représentant les variations des hauteurs de pics en fonction du degré alcoolique (fig. 16) ; comme on pouvait s'y attendre, l'alcool dilue, dans l'extrait, les substances volatiles dont la hauteur des pics diminue lorsque le degré alcoolique augmente ; seul le formiate d'éthyle qui est très volatil, a une concentration qui augmente légèrement ; nous n'avons pas su expliquer ce phénomène.

TABLEAU XI

**Comparaison des extractions en fonction du degré alcoolique**

**Conditions :** extraction de 300 $cm^3$ de vin + 100 $cm^3$ de solutions hydro-alcooliques de titre variable = 400 $cm^3$, par l'azote : débit 150 $cm^3$/mn, durée de l'extraction : 0 h 30, sensibilité de l'enregistreur : x 2 sauf indication contraire.

| | Co-lonne | Degré alcoolique du mélange | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 9° | 10° | 11° | 12° | 13° |
| Formiate d'éthyle ... | ESD | 121 | 154 | 148 | 160 | 185 |
| Acétate de méthyle . | ESD | 18 | 20 | 18 | 18 | 19 |
| Acétate d'éthyle .... | C+H | 177×160 | 184×160 | 160×160 | 161×160 | 163×160 |
| Acétal ..... | C+H | 10×4 | 10×4 | 9×4 | 8×4 | 8×4 |
| Méthanol ..... | C+H | 200×4 | 181×4 | 175×4 | 162×4 | 155×4 |
| Propionate d'éthyle . | C+H | 135×8 | 135×8 | 110×8 | 107×8 | 101×8 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | ESD | 130 | 123 | 104 | 100 | 92 |
| Butyrate d'éthyle + acétate de méthyl-2 propyle ..... | ESD | 64 | 58 | 50 | 47 | 42 |
| Propanol-1 ..... | C+H | 81 | 66 | 63 | 50 | 45 |
| Méthyl-2 propanol-1 + acétate de méthyl-3 butyle ..... | C+H | 240×4 | 207×4 | 174×4 | 152×4 | 129×4 |
| Ester inconnu ..... | C+H | 20 | 20 | 20 | 21 | 18 |
| Méthyl-2 butanol-1 .. | ESD | 130 | 104 | 83 | 60 | 41 |
| Méthyl-3 butanol-1 .. | ESD | 400 | 322 | 248 | 187 | 126 |
| Poids des extraits .. | | 0,107 g | 0,158 g | 0,187 g | 0,200 g | 0,209 g |

Les résultats représentant des hauteurs de pics sont exprimés en mm.

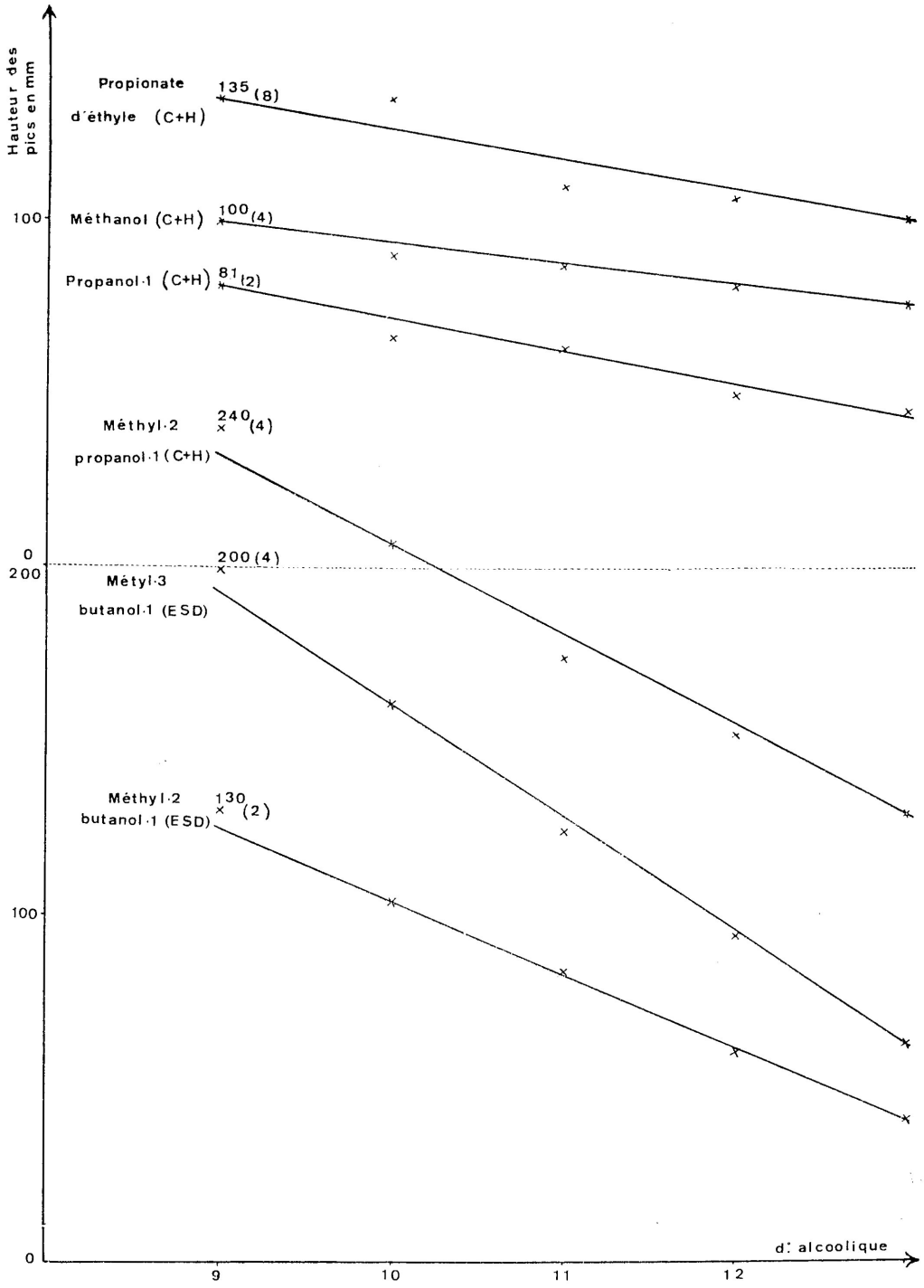



Fig. 16. - Influence du degré alcoolique du milieu extrait sur la hauteur des pics du chromatogramme.

TABLEAU XII

**Comparaison des extractions à degré alcoolique constant, en fonction de la dilution du vin**

**Conditions :** Extraction de 300 cm³ de mélanges, vin + solution hydroalcoolique, ramenés à 9° par dilution ; courant d'azote de 150 cm³/mn ; durée de l'extraction : 0 h 30.

| | Colonne | Sensibilité | Coefficients de dilution | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1,33 | | 1,48 | | 1,63 | | 1,78 | | 1,92 | |
| | | | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| Formiate d'éthyle ..... | ESD | 4 | 240 | 320 | 225 | 330 | 205 | 334 | 180 | 320 | 157 | 301 |
| Acétate de méthyle ..... | ESD | 2 | 50 | 67 | 47 | 69 | 43 | 70 | 37 | 66 | 33 | 63 |
| Acétate d'éthyle ..... | C+H | 160 | 204 | 276 | 192 | 282 | 182 | 294 | 172 | 305 | 153 | 292 |
| Méthanol ..... | C+H | 4 | 208 | 276 | 200 | 296 | 194 | 316 | 176 | 313 | 162 | 311 |
| Propionate d'éthyle ..... | C+H | 8 | 135 | 179 | 130 | 192 | 128 | 208 | 121 | 215 | 106 | 203 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | ESD | 2 | 184 | 245 | 185 | 273 | 165 | 269 | 152 | 270 | 145 | 278 |
| Butyrate d'éthyle + acétate de méthyl-2 propyle . | ESD | 2 | 90 | 110 | 88 | 130 | 86 | 140 | 80 | 142 | 75 | 144 |
| Propanol-1 ..... | C+H | 2 | 82 | 109 | 76 | 116 | 72 | 117 | 72 | 128 | 61 | 117 |
| Méthyl-2 propanol-1 + acétate de méthyl-3 butyle . | C+H | 8 | 135 | 179 | 125 | 185 | 115 | 188 | 114 | 203 | 100 | 192 |
| Ester inconnu ..... | C+H | 2 | 24 | 32 | 22 | 33 | 22 | 36 | 20 | 36 | 18 | 35 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | ESD | 4 | 100 | 133 | 92 | 136 | 84 | 137 | 80 | 142 | 73 | 140 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | ESD | 4 | 294 | 391 | 276 | 408 | 253 | 412 | 245 | 436 | 232 | 445 |
| Poids des extraits ..... | | | 0,130 g | | 0,116 g | | 0,109 g | | 0,086 g | | 0,080 g | |

A = hauteur des pics sur le chromatogramme.

B = hauteur des pics après application du coefficient de dilution.

Il ressort de cette étude que deux vins possédant les mêmes substances, aux mêmes concentrations, mais ayant des degrés alcooliques différents, donnent des extraits de composition différente ; pour résoudre cette difficulté nous avons systématiquement ramené tous les vins à analyser à un même degré alcoolique (10°).

Pour vérifier que ce mode opératoire est correct nous avons réalisé l'expérience suivante : des échantillons d'un même vin sont d'abord amenés à des degrés alcooliques différents pour un même volume total, par conséquent pour une même concentration de toutes les substances autres que l'éthanol ; ensuite tous les échantillons sont ramenés au même degré alcoolique (9°) par addition d'eau ; dans ces conditions, toutes les substances sont diluées de manière différente et connue suivant les échantillons, sauf l'éthanol qui est constant. Pour chaque échantillon nous avons un coefficient de dilution des substances : 1,33, 1,48, 1,63, 1,78, et 1,92. Si le mode opératoire est valable, après extraction de 300 $cm^3$ de chaque échantillon, dans les conditions habituelles et multiplication des hauteurs de pics par le coefficient de dilution, on doit trouver des valeurs identiques pour chacun d'eux. Les résultats sont portés dans le tableau XII ; on constate que les hauteurs de pics ont sensiblement les mêmes valeurs après application du coefficient de dilution (colonnes B du tableau XII) ; les irrégularités sont sans doute dues bien plus aux analyses chromatographiques qu'aux extractions proprement dites.

Il ressort donc de cette expérience que le degré alcoolique a une grande importance dans l'extraction par l'azote. Il faut ramener, avant extraction, tous les échantillons à un même degré alcoolique (10°) par addition d'eau, et ensuite calculer les concentrations réelles des différentes substances par application du coefficient de dilution.

### 3° PROPORTIONNALITE DE L'EXTRACTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION.

Afin de vérifier la proportionnalité de l'extraction en fonction de la concentration de chaque substance, nous avons extrait des solutions hydro-alcooliques, contenant les mêmes constituants volatils que le vin, à des concentrations variables. Nous avons ainsi préparé une solution hydro-alcoolique à 10° contenant 5 g/l d'acide tartrique, neutralisé partiellement par la soude N jusqu'à pH 3, et 0,6 g/l d'acide acétique. Cette solution de base a reçu des doses croissantes (0 à 5 $cm^3$ dans 300 $cm^3$ de mélange) d'une solution mère à 25° d'alcool contenant, pour 100 $cm^3$ :

— 1,6 g de méthanol ;

— 0,8 g de propanol-1 ;

— 1,6 g de méthyl-2 propanol-1 ;

— 0,2 g de butanol-1 ;

— 5 g de méthyl-2 butanol-1 + méthyl-3 butanol-1 ;

— 13,6 mg de formiate d'éthyle ;

— 14,5 mg d'acétate de méthyle ;

— 3,6 g d'acétate d'éthyle ;

— 0,22 g de propionate d'éthyle ;

— 0,9 mg d'acétate de propyle ;

— 9 mg d'acétate de méthyl-2 propyle ;

— 9 mg de méthyl-2 propionate d'éthyle ;

— 4,4 mg de butyrate d'éthyle.

Les mélanges (au nombre de 8) ainsi préparés ont été extraits par un courant d'azote suivant la technique habituelle ; les extraits ont été chromatographiés sur colonnes ESD et C + H et les hauteurs des principaux pics reportées dans le tableau XIII.

Nous avons tracé les courbes représentant la variation des hauteurs de pics en fonction de la quantité de solution mère ajoutée à la solution synthétique de base ; dans tous les cas nous avons obtenu des droites (fig. 17 A et 17 B).

Cette expérience permet de tirer les conclusions suivantes :

— La concentration d'une substance dans l'extrait est proportionnelle à la concentration de cette substance dans la solution à analyser.

— L'extraction d'un constituant est indépendante de la concentration des autres, à l'exception de celle de l'éthanol comme nous l'avons montré dans le paragraphe 2.

— On peut donc effectuer un dosage des différents constituants de l'extrait après avoir défini pour chacun d'eux un coefficient d'extraction.

TABLEAU XIII

**Extraction des solutions synthétiques de titres connus**

**Conditions :** Extraction de 300 cm³ de solutions synthétiques par un courant d'azote de 150 cm³/mn ; durée de l'extraction : 0 h 30.

| | Colonne | Sensibilité | Volumes en cm³, de solution mère, ajoutés à la solution synthétique de base, le volume total étant de 300 cm³. | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Formiate d'éthyle ..... | ESD | 2 | 4 | 9 | 20 | 27 | 31 | 43 | 59 | 84 |
| Acétate de méthyle ..... | ESD | 2 | 2 | 3 | 7 | 11 | 15 | 21 | 29 | 40 |
| Acétate d'éthyle ..... | C+H | 160 | 20 | 70 | 125 | 189 | 246 | 324 | 440 | 592 |
| Méthanol ..... | C+H | 2 | 45 | 70 | 102 | 147 | 173 | 250 | 316 | 360 |
| Propionate d'éthyle ..... | C+H | 32 | 6 | 26 | 51 | 76 | 101 | 135 | 185 | 220 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | ESD | 2 | 9 | 28 | 63 | 98 | 130 | 178 | 240 | 292 |
| Butyrate d'éthyle + acétate de méthyl-2 propyle. | ESD | 2 | 11 | 30 | 70 | 108 | 145 | 208 | 270 | 328 |
| Propanol-1 ..... | C+H | 2 | 8 | 24 | 45 | 70 | 86 | 138 | 178 | 224 |
| Méthyl-2 propanol-1 + acétate de méthyl-3 butyle. | C+H | 2 | 25 | 81 | 155 | 228 | 292 | 420 | 540 | 720 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | ESD | 2 | 11 | 18 | 39 | 58 | 77 | 104 | 148 | 176 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | ESD | 2 | 20 | 53 | 114 | 167 | 212 | 318 | 412 | 500 |
| Poids des extraits en g .. | | | 0,161 | 0,174 | 0,183 | 0,167 | 0,177 | 0,196 | 0,180 | 0,179 |

Les résultats sont exprimés en hauteur de pics, en mm.

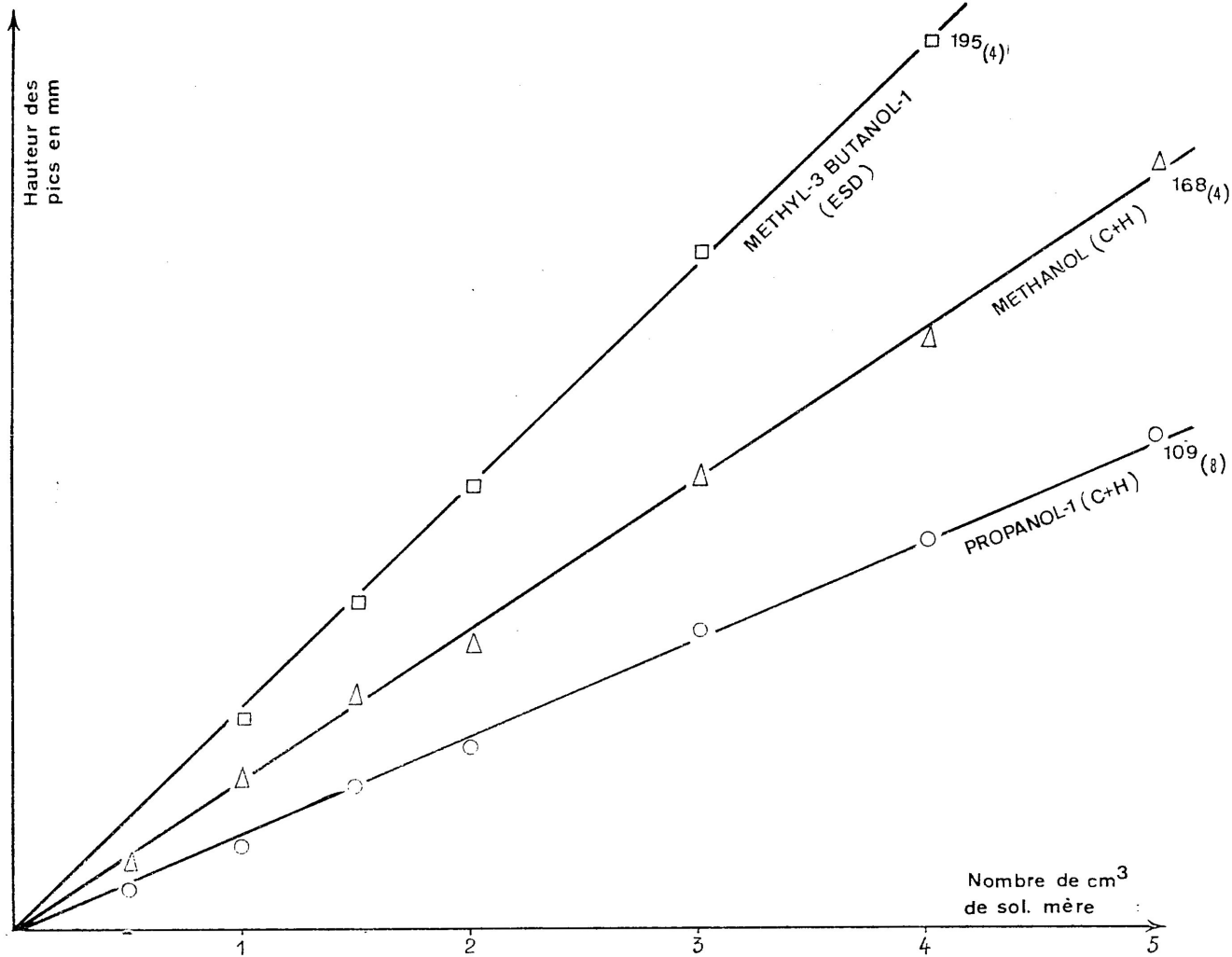



Fig. 17 A. - Variations de la hauteur des pics, en fonction du volume de solution mère ajouté au milieu avant extraction.

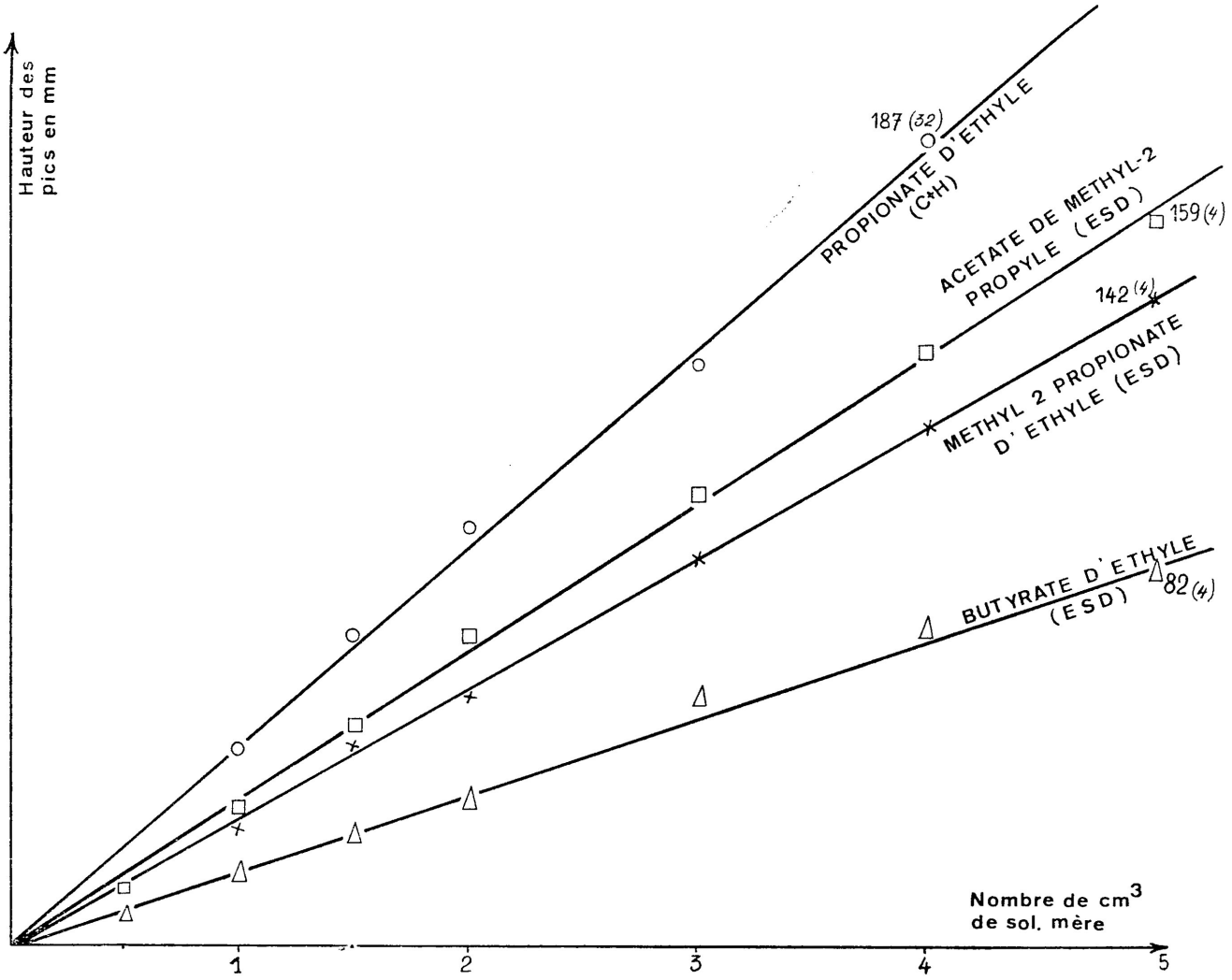



Fig. 17 B - Variations de la hauteur des pics, en fonction du volume de solution mère ajouté au milieu, avant extraction.

## 4° DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'EXTRACTION.

Afin de pouvoir doser les corps volatils présents dans le vin à des doses très faibles (inférieures à 1 mg/l) il était nécessaire de connaître le rapport des concentrations de ces substances dans l'extrait et dans le vin.

Nous avons donc fait une série d'expériences destinées à déterminer expérimentalement ces coefficients d'extraction.

a) **Préparation des solutions témoins servant au dosage des substances de l'extrait.** — Tout comme pour le dosage des substances volatiles du vin par injection directe (page 198), nous avons préparé quatre solutions témoins contenant tous les corps à doser, à des concentrations variables, ces quatre solutions témoins, injectées dans les mêmes conditions que les extraits à analyser, permettent d'établir des courbes étalons auxquelles il suffit de rapporter la hauteur des pics représentant les substances de l'extrait, pour déterminer les concentrations de ces dernières. Ces quatre solutions témoins ont été préparées à partir d'une solution de base contenant pour 1 litre d'une solution hydroalcoolique à 80° d'alcool :

— 1,6 g de méthanol et de méthyl-2 propanol-1 ;

— 0,4 g de propanol-1 ;

— 1,38 g de méthyl-2 butanol-1 ;

— 4,62 g de méthyl-3 butanol-1 ;

— 25 mg de formiate d'éthyle et d'acétate de propyle ;

— 50 mg d'acétate de méthyle, d'acétate de méthyl-2 propyle et d'acétate d'hexyle ;

— 20 g d'acétate d'éthyle ;

— 0,5 g de propionate d'éthyle ;

— 0,2 g de méthyl-2 propionate d'éthyle ;

— 0,18 g de butyrate d'éthyle ;

— 10 mg de méthyl-2 butyrate d'éthyle ;

— 40 mg de méthyl-3 butyrate d'éthyle ;

— 1 g d'acétate de méthyl-3 butyle.

Cette solution de base et cette même solution diluée 2, 4 et 8 fois constituent les quatre solutions témoins.

b) **Préparation des solutions servant à la détermination des coefficients d'extraction.** — Pour déterminer les coefficients d'extraction, nous avons préparé les solutions suivantes :

— **Solution 1** contenant les alcools et l'acétate d'éthyle soit, pour 1 litre d'une solution à 25° d'alcool :

— 8 g de méthanol et de méthyl-2 propanol-1 ;

— 2 g de propanol-1 ;

— 6,9 g de méthyl-2 butanol-1 ;

— 23,1 g de méthyl-3 butanol-1 ;

— 6 g d'acétate d'éthyle.

Nous avons préparé cette solution par dilution d'un mélange dix fois plus concentré.

— **Solution 2** contenant les esters soit, pour 1 litre d'une solution à 25° d'alcool :

— 2,5 mg de formiate d'éthyle et d'acétate de propyle ;

— 5 mg d'acétate de méthyle, d'acétate de méthyl-2 propyle et d'hexanoate d'éthyle ;

— 50 mg de propionate d'éthyle ;

— 20 mg de méthyl-2 propionate d'éthyle ;

— 18 mg de butyrate d'éthyle ;

— 1 mg de méthyl-2 butyrate d'éthyle ;

— 4 mg de méthyl-3 butyrate d'éthyle ;

— 10 mg d'acétate de méthyl-3 butyle.

Nous avons préparé cette solution par dilution d'un mélange mille fois plus concentré.

— **Solution synthétique de base** à 10° d'alcool, pH 3, contenant 0,5 g d'acide acétique par litre.

TABLEAU XIV

**Calcul des coefficients d'extraction**

| | Concentration initiale, en mg/l | Concentration dans l'extrait, en mg/l | | | Coefficient d'extraction | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 10° | 5° | 2°5 | 10° | 5° | 2°5 |
| Méthanol ..... | 80 | 560 | 800 | 1 500 | 7 | 10 | 18 |
| Propanol-1 ..... | 20 | 160 | 300 | 500 | 8 | 15 | 25 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 80 | 1 280 | 2 800 | 4 400 | 16 | 35 | 55 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 69 | 970 | 2 280 | 3 450 | 14 | 33 | 50 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 231 | 3 000 | 6 700 | 10 400 | 13 | 29 | 45 |
| Formiate d'éthyle ..... | 0,025 | 6,5 | 4,5 | 2 | 260 | 180 | 70 |
| Acétate de méthyle ..... | 0,05 | 12,5 | 8,5 | 3 | 250 | 170 | 65 |
| Acétate d'éthyle ..... | 60 | 13 800 | 18 000 | 22 200 | 230 | 300 | 370 |
| Propionate d'éthyle ..... | 0,5 | 155 | 225 | 310 | 310 | 450 | 620 |
| Acétate de propyle ..... | 0,025 | 9 | 12,5 | 17,5 | 350 | 500 | 700 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 0,2 | 100 | 180 | 240 | 500 | 900 | 1 200 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 0,18 | 95 | 170 | 230 | 530 | 950 | 1 300 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 0,05 | 25 | 45 | 60 | 500 | 900 | 1 200 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0,01 | 7 | 12 | 15 | 730 | 1 200 | 1 500 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0,04 | 30 | 48 | 60 | 730 | 1 200 | 1 500 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,10 | 50 | 90 | 120 | 500 | 900 | 1 200 |
| Hexanoate d'éthyle ..... | 0,05 | 27,5 | 50 | 67,5 | 550 | 1 000 | 1 350 |

Nous avons préparé les mélanges à extraire en ajoutant, à la solution synthétique, différents volumes des solutions 1 et 2 (1,5, 3, 6 $cm^3$ de chaque) pour un volume final de 300 $cm^3$. L'addition de 3 $cm^3$ des solutions 1 et 2 à la solution synthétique de base donne, pour les différentes substances, les concentrations initiales portées dans la première colonne du tableau XIV.

c) **Extraction des solutions servant à la détermination des coefficients d'extraction.** — Les solutions ainsi préparées ont été extraites par l'azote, suivant la technique habituelle, et les extraits chromatographiés sur colonnes Carb. 1540 et ESD. Les concentrations des substances des différents extraits ont été déterminées à partir des solutions témoins injectées dans les mêmes conditions. La moyenne de ces concentrations est portée dans le tableau XIV. Connaissant la concentration des substances de l'extrait, et leur concentration initiale, nous avons pu déterminer des coefficients d'extraction (tableau XIV). Les résultats de ce tableau représentent la moyenne de plusieurs déterminations.

d) **Détermination des coefficients d'extraction à différents degrés d'alcool.** — Nous avons eu l'occasion de travailler avec des solutions contenant moins de 10° d'alcool ; il aurait donc fallu ramener ces solutions à 10° par addition d'alcool pur ; mais, même l'alcool le plus pur du commerce, contient des impuretés très volatiles qui, après extraction, viennent masquer les substances propres du milieu étudié. Pour cela nous avons été amené à déterminer des coefficients d'extraction à différents degrés (5° et 2°5), de la même manière que nous l'avons fait pour les solutions à 10°. Les concentrations des substances de l'extrait, et les coefficients d'extraction sont portés dans le tableau XIV. Ceci complique sans doute les calculs, mais augmente très certainement la précision des résultats.

Sachant que l'extraction est reproductible et proportionnelle à la concentration des corps étudiés d'une part, connaissant les coefficients d'extraction de chacun de ces corps d'autre part, on peut utiliser cette méthode pour le dosage.

## 5° CONTROLE CHIMIQUE DU DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ACETATE D'ETHYLE ET DU METHANOL APRES EXTRACTION.

Nous avons vérifié que cette nouvelle méthode de dosage est en accord avec les méthodes chimiques dans le cas de l'acétate d'éthyle et du méthanol.

a) **Dosage de l'acétate d'éthyle.** — Nous avons préparé des solutions hydroalcooliques à 10° contenant 91 et 182 mg/l d'acétate d'éthyle (100 et 200 mm³) ; d'autre part nous avons ajouté les mêmes quantités de cet ester dans un vin. Nous avons dosé chimiquement l'acétate d'éthyle de ces cinq solutions par la méthode PEYNAUD (104), de même que nous en avons fait un dosage chromatographique par injection directe. Egalement nous avons extrait ces solutions par un courant d'azote, suivant la technique habituelle, et nous avons dosé l'acétate d'éthyle des extraits, à l'aide des solutions synthétiques témoins préparées pour la détermination des coefficients d'extraction.

Après avoir déterminé la concentration de l'acétate d'éthyle des extraits, nous avons calculé la quantité de ce corps présente dans la solution initiale, par application du coefficient d'extraction qui est de 230. Les résultats de ces différents dosages ont été reportés dans le tableau XV. On constate que les résultats donnés par les deux méthodes sont tout à fait comparables.

TABLEAU XV

**Dosage chimique et chromatographique de l'acétate d'éthyle**

| | Dosage chromatographique | | Dosage chimique, en mg/l |
|---|---|---|---|
| | Concentration dans les extraits, en g/l | Concentration initiale calculée, en mg/l | |
| Solution synthétique 1 .. | 20,5 | 89 | 91 |
| Solution synthétique 2 .. | 41,5 | 180 | 181 |
| Vin ..... | 25 | 109 | 104 |
| Vin + 91 mg/l ..... | 46,25 | 201 | 195 |
| Vin + 182 mg/l ..... | 66,25 | 288 | 285 |

b) **Dosage du méthanol.** — Pour effectuer le dosage du méthanol, d'une part nous avons préparé des mélanges contenant 50, 100, 150, 200 et 250 mg/l de cet alcool dans une solution hydroalcoolique à 10°, d'autre part nous utilisons un vin enrichi par 50 et 100 mg/l de cet alcool. A partir des solutions synthétiques nous avons établi des gammes étalons pour

la méthode colorimétrique [méthode TAVERNIER et JACQUIN (105)], et pour la méthode chromatographique de dosage du méthanol par injection directe. Egalement, nous avons extrait par l'azote suivant la technique habituelle les trois vins et nous avons pu doser le méthanol des extraits par chromatographie sur colonne C + H et par comparaison aux solutions synthétiques témoins ayant servi à la détermination des coefficients d'extraction.

Connaissant la concentration dans les extraits, nous avons pu calculer la teneur en méthanol des différents échantillons étudiés par application du coefficient d'extraction qui est de 7 ; nous avons reporté les résultats dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI

**Dosage chimique et chromatographique du méthanol**

| | Dosage chromatographique après extraction | | Dosage colorimétrique |
|---|---|---|---|
| | Concentration dans les extraits | Concentration initiale calculée | |
| Vin ..... | 900 | 129 | 134 |
| Vin + 50 mg/l ..... | 1230 | 176 | 182 |
| Vin + 100 mg/l ..... | 1600 | 229 | 226 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Ces résultats, de même que ceux obtenus dans le cas de l'acétate d'éthyle, montrent la bonne concordance, aux erreurs d'expérience près, existant entre les dosages chimiques et les dosages chromatographiques des substances volatiles du vin.

## 6° CONTROLE DU DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUE DES SUBSTANCES VOLATILES APRES EXTRACTION.

Après avoir vérifié la reproductibilité et la proportionnalité de l'extraction, nous avons vérifié la concordance entre les dosages chimiques et chromatographiques des substances ; il nous restait à vérifier que nous

TABLEAU XVII

**Contrôle du dosage des substances volatiles du vin après extraction par un courant d'azote**

| | | Volumes des solutions 1 et 2 ajoutés à 300 cm³ de vin | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + 1 cm³ | | + 2 cm³ | | + 3 cm³ | |
| | $C_i$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ | $C_m$ | $C_t$ |
| Méthanol ..... | 970 | 1 160 | 1 157 | 1 320 | 1 344 | 1 500 | 1 530 |
| Propanol-1 ..... | 124 | 178 | 171 | 240 | 230 | 298 | 284 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 936 | 1 408 | 1 363 | 1 888 | 1 790 | 2 348 | 2 216 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 966 | 1 300 | 1 289 | 1 640 | 1 612 | 2 000 | 1 936 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 2 195 | 3 342 | 3 195 | 4 342 | 4 195 | 5 358 | 5 195 |
| Acétate d'éthyle ..... | 20 200 | 24 400 | 24 800 | 29 000 | 29 400 | 33 800 | 34 000 |
| Propionate d'éthyle ..... | 277 | 330 | 276 | 392 | 381 | 448 | 432 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 149 | 189 | 182 | 224 | 216 | 258 | 249 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 15 | 29 | 32 | 50 | 49 | 64 | 65 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 153 | 209 | 213 | 278 | 273 | 320 | 333 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 26 | 65 | 69 | 124 | 112 | 160 | 156 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 22 | 38 | 39 | 53 | 55 | 69 | 72 |

$C_i$ : concentration initiale ; $C_m$ : concentration mesurée ; $C_t$ : concentration théorique.
Les résultats sont exprimés en mg/l.

retrouvions bien, après extraction, des quantités connues de substances rajoutées dans le vin. Pour ce faire, nous avons déterminé la concentration des différentes substances de l'extrait d'un vin rouge. Nous avons ensuite ajouté dans ce vin des quantités croissantes des solutions 1 et 2, préparées pour la détermination des coefficients d'extraction, et nous avons extrait les mélanges ainsi préparés de la même manière que le vin seul ; les concentrations des différentes substances des extraits ont été déterminées chromatographiquement et, connaissant les coefficients d'extraction, nous avons calculé la concentration théorique de tous ces corps. L'ensemble de ces résultats est reporté dans le tableau XVII.

Dans cette expérience nous constatons également que les différences entre les résultats expérimentaux et les résultats théoriques sont faibles, ceci malgré un grand nombre de manipulations et l'intervention de très nombreux paramètres qui sont autant de causes d'erreurs.

En résumé, nous avons voulu montrer dans ce chapitre que nous disposions d'une méthode d'extraction des substances volatiles du vin, rapide, reproductible, fidèle et précise ; il nous est donc désormais possible d'utiliser cette méthode pour le dosage de tous les alcools du vin jusqu'au méthyl-3 butanol-1 et de tous les esters volatils jusqu'à l'hexanoate d'éthyle. Nous avons vu, dans le chapitre III, que certains de ces alcools, ainsi que l'acétate d'éthyle, peuvent être dosés par injection directe ce qui augmente la précision de leur dosage ; mais d'autres esters, en particulier le méthyl-3 butyrate d'éthyle, l'acétate de méthyl-3 butyle et l'hexanoate d'éthyle, qui doivent jouer un rôle important dans le bouquet des vins, ne sont pas décelables par injection directe et doivent être dosés avec cette nouvelle méthode. Certainement, on augmenterait la précision de cette méthode, et sans doute aussi le dosage par injection directe, en utilisant un étalon interne ; cette technique permet de rendre le dosage indépendant des variations des conditions d'extraction et de chromatographie. En effet, elle consiste à ajouter dans le milieu, avant dosage, une quantité connue d'un corps bien séparable, auquel devrait correspondre un pic de hauteur constante connue. Si le pic obtenu ne correspond pas à cette hauteur, par suite d'une fluctuation dans le mode opératoire, on multipliera tous les autres pics du chromatogramme par le coefficient :

$$\frac{\text{hauteur théorique du pic de l'étalon interne}}{\text{hauteur réelle du pic de l'étalon interne}}$$

CHAPITRE VI

# APPLICATION DES TECHNIQUES CHROMATHOGRAPHIQUES AU DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DES VINS ET MILIEUX DE FERMENTATION

## INTRODUCTION

Les produits volatils rencontrés dans le vin sont essentiellement issus de la fermentation alcoolique ; c'est pourquoi nous avons étudié la formation de ces corps au cours de la fermentation de milieux synthétiques et de moûts de raisin. Nous avons commencé cette étude par la recherche de l'influence de la pureté du saccharose utilisé, sur la formation des produits volatils pour expliquer, dans certains cas, la formation de méthanol. Nous nous sommes ensuite attaché à préciser le rôle des différentes souches de levures, ainsi que celui de l'oxygène, dans la formation des substances odorantes au cours de la fermentation ; également nous avons étudié le taux de ces substances en fonction de l'alcool formé.

Nous avons ensuite étudié quelques vins en cherchant au maximum à comparer l'analyse chimique et les résultats de la dégustation, nous avons ainsi comparé quelques vins d'origine, de mode de vinification et d'âge différents.

## 1° COMPOSITION DU MILIEU DE FERMENTATION.

Le milieu synthétique employé est celui proposé par LAFON-LAFOURCADE (106) contenant, pour un litre de solution:

— 180 g de saccharose ;

— $(NH_4)_2 SO_4$;

— 2 g d'asparagine ;

— 2 g de phosphate acide de potassium ;

— 6 g d'acide citrique.

— Cendres de levures de boulangerie, remplacées par le milieu minéral suivant : 200 mg Mg $SO_4$,7 $H_2O$, 10 mg $MnSO_4$, 2 mg $FeCl_3$, 10 mg NaCl.

Tous ces corps sont mis en solution dans de l'eau bidistillée et le pH du milieu est ensuite amené à 3,2 par de la potasse concentrée.

— Facteurs de croissance : biotine 20 γ, mésoinositol 10 mg, thiamine 0,2 mg, pyridoxine 0,2 mg, acide nicotinique 0,2 mg, acide pantothénique 0,2 mg, acide **p**-aminobenzoïque 0,2 mg.

D'autre part nous avons fait parallèlement des expériences sur du moût de raisins blancs, pasteurisé et conservé en bouteilles.

2° ETUDE DE FERMENTATIONS DE MILIEUX SYNTHETIQUES ET DE MOUTS.

a) **Influence de la qualité du saccharose.** — Nous avons été amené à faire une expérience concernant l'influence de la qualité du saccharose sur la formation des produits volatils, après avoir remarqué la formation de méthanol lors de fermentations de milieux théoriquement dépourvus de pectines ; en effet, il est couramment admis que la fermentation ne forme pas de méthanol et que cet alcool provient, dans le vin, exclusivement de la déméthoxylation des pectines.

Pour cela nous avons utilisé dans le milieu synthétique précédemment décrit, 180 g de saccharose « raffiné » (milieu A) d'une part et 180 g de saccharose « pur pour laboratoire » (milieu B) d'autre part ; nous disposions en outre d'un moût, d'ailleurs peu riche en sucres. Nous avons fait fermenter ces trois milieux après les avoir ensemencés par deux souches **de Saccharomyces ellipsoideus** et une souche de **Saccharomyces oviformis.** Au bout de 21 jours, nous avons analysé les neuf échantillons, par injection directe dans le chromatographe ; les résultats sont reportés dans le tableau XVIII ; on note, sur ce tableau, que la fermentation est moins complète et l'éthanal formé plus important dans le milieu B. Mais, c'est surtout dans la teneur en méthanol que réside la différence principale ; en effet, le saccharose « raffiné » conduit à la formation d'une très faible quantité de méthanol, alors que le saccharose « pur » conduit à la formation d'une centaine de mg de ce corps. Nous avons donc conclu que le saccharose « pur » contient des matières pectiques qui sont hydrolisées par la levure lors de la fermentation, avec formation de méthanol. Cette conclusion est confirmée par les faits suivants :

TABLEAU XVIII

**Comparaison des substances volatiles formées par différentes levures en fonction du milieu de fermentation**

| | Saccharomyces ellipsoideus I | | | Saccharomyces ellipsoideus II | | | Saccharomyces oviformis | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | milieu A* | milieu B* | moût | milieu A | milieu B | moût | milieu A | milieu B | moût |
| **Ethanol** ..... | **12°2** | **8°** | **6°5** | **11°6** | **9°2** | **6°6** | **12°2** | **8°6** | **6°2** |
| Ethanal ..... | 35 | 70 | 15 | 30 | 44 | 14 | 107 | 245 | 32 |
| Méthyl-2 propanal .. | 25 | 31 | 8 | 30 | 30 | 10 | 28 | 32 | 10 |
| Acétate d'éthyle .... | 59 | 33 | 25 | 52 | 47 | 23 | 72 | 46 | 36 |
| **Méthanol** ..... | **1** | **97** | **30** | **2** | **91** | **25** | **4** | **100** | **25** |
| Propanol-1 ..... | 14 | 16 | 22 | 14 | 18 | 22 | 16 | 16 | 21 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 22 | 15 | 50 | 17 | 21 | 47 | 13 | 11 | 19 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 .. | 100 | 72 | 140 | 88 | 77 | 100 | 115 | 56 | 50 |

Les résultats sont exprimés en mg/l sauf pour l'éthanal et le méthyl-2 propanal qui correspondent aux hauteurs de pics.
* Milieux A et B, cf. texte.

— Un échantillon du milieu B, non fermenté, ne contient pas de méthanol.

— En l'absence de toute fermentation, l'action du « pectinol », préparation contenant de la pectine-méthyl-estérase, à 40 °C, durant douze heures, sur les milieux A et B, produit des traces de méthanol dans le milieu A et une centaine de mg dans le milieu B.

b) **Influence de la souche de levures.** — Nous avons comparé les produits, formés par différentes souches de levures, fermentant, d'une part une solution synthétique contenant 180 g/l de saccharose « pur pour laboratoire » d'autre part un moût amené à 192 g/l de sucre par addition de saccharose. La fermentation s'est déroulée à 25 °C dans des bouteilles de 750 $cm^3$, contenant 600 $cm^3$ de milieu. On a comparé aussi l'influence de différentes conditions d'oxygénation. La solution synthétique a fermenté, d'une part en semi-aérobiose dans des flacons bouchés par un tampon d'ouate stérile, d'autre part en anaérobiose stricte dans des récipients bouchés par un barboteur double contenant, d'abord une solution concentrée de pyrogallate de potassium, pour éliminer toute trace d'oxygène, ensuite de l'eau ; avant fermentation, l'air contenu dans les bouteilles,

au-dessus du liquide a été remplacé par du gaz carbonique. Le moût a fermenté également en semi-aérobiose (tampon d'ouate) et en anaérobiose dans des flacons munis de barboteurs à eau. Enfin, nous devons préciser que le saccharose utilisé est responsable de la formation d'importantes quantités de méthanol ; mais nous avons vu dans le paragraphe précédent qu'il provient de la déméthoxylation, lors de la fermentation, des pectines contenues dans le saccharose.

Ces différents milieux ont fermenté durant trente jours ; nous avons ensuite analysé les substances volatiles, soit par injection directe, soit après extraction. Nous avions réalisé plusieurs expériences de ce genre ; les résultats de l'une d'elles sont reportés dans le tableau XIX.

Nous avons retenu pour nos conclusions les faits observés à plusieurs reprises.

— **Kloeckera apiculata** forme 5 à 10 fois plus d'acétate d'éthyle que les autres souches ; la formation est particulièrement importante en aérobiose. Le formiate d'éthyle et l'acétate de méthyle sont aussi formés en quantités notables. Enfin les alcools isomères, méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1, généralement dans le rapport 1/3 à 1/4 sont ici dans un rapport voisin de l'unité ; cette observation a été renouvelée à cinq reprises. Cette levure ne semble pas former d'hexanoate d'éthyle, mais par contre une quantité appréciable d'acétate de méthyl-3 butyle.

— **Saccharomycodes ludwigii** est surtout caractérisée par une importante production de méthyl-2 propanol-1 en aérobiose ; le méthyl-2 propionate d'éthyle est, lui aussi, formé en quantité appréciable. Ce phénomène a été observé à quatre reprises. Cette levure ne semble pas former d'hexanoate d'éthyle.

— **Schizosaccharomyces liquefaciens** forme une faible quantité d'alcools supérieurs, en particulier dans la fermentation de la solution synthétique. Ce phénomène a été observé à cinq reprises.

— **Saccharomyces ellipsoideus** est prise comme levure de référence, puisque c'est la levure la plus fréquente en œnologie.

— **Saccharomyces oviformis** conduit à une quantité importante d'éthanal, phénomène observé à trois reprises, mais nous n'avons pas retrouvé ce fait dans la littérature. Cette levure forme une quantité relativement importante de propionate d'éthyle.

TABLEAU XIX

**Dosage des substances volatiles de quelques milieux de fermentation**

| | Kloeckera apiculata | | | | Saccharomycodes ludwigii | | | | Schizo. liquefaciens | | | | Sacch. ellipsoideus | | | | Sacch. oviformis | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sol. synt. | | Moût | | Sol. synt. | | Moût | | Sol. synt. | | Moût | | Sol. synt. | | Moût | | Sol. synt. | | Moût | |
| | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. | ana. | aéro. |
| Ethanol | 1 | 3'75 | 3 | 4 40 | 0 4 | 8'75 | 5'4 | 5'5 | 6 5 | 11 6 | 6 25 | 11'6 | 8'75 | 11 25 | 11'25 | 11'25 | 8'4 | 10 9 | 12 1 | 12* |
| Ethanal | 7,2 | 10,1 | 6,1 | 6,4 | 22 | 5,5 | 6,1 | 5,2 | 16,5 | 9 | 10 | 5,2 | 9,5 | 6,4 | 3,4 | 7,7 | 36 | 51 | 5,2 | 34,5 |
| Méthyl-2 propanal | 4,3 | 4,6 | 2 | 2,6 | 4 | 5,6 | 3 | 4,8 | 4,3 | 8 | 3,3 | 4,5 | 4,7 | 6,2 | 1,7 | 3,6 | 4,8 | 4,9 | 2,3 | 5,5 |
| Méthanol* | 85 | 74 | 11,5 | 9,5 | 77 | 70 | 17 | 70 | 100 | 148 | 8 | 45 | 152 | 156 | 16 | 15 | 156 | 136 | 17 | 25 |
| Propanol-1 | 11 | 30 | 16 | 32 | 0 | 31 | 20 | 36 | 7 | 15 | 15 | 13 | 15,5 | 26 | 22 | 25 | 20 | 42,5 | 30 | 18 |
| Méthyl-2 propanol-1 | 14 | 27 | 21 | 38 | 0 | 123 | 36 | 119 | 0 | 14 | 0 | 21 | 22 | 41,5 | 31 | 21 | 8,5 | 23,5 | 51 | 44,5 |
| Méthyl-2 butanol-1 | 3,8 | 7,7 | 5,3 | 10 | 3,3 | 37 | 45 | 47,5 | 0 | 0 | 0 | 21 | 18 | 34 | 30 | 33 | 8 | 18 | 24,5 | 39 |
| Méthyl-3 butanol-1 | 3,8 | 7,7 | 7,7 | 17 | 6 | 71 | 63 | 62 | 0 | 0 | 0 | 41 | 61 | 82 | 90 | 80 | 44 | 86 | 83,5 | 132 |
| Formiate d'éthyle | 0,13 | 0,68 | 0,67 | 0,44 | 0 | 0,19 | 0,25 | 0,72 | 0,11 | 0,14 | 0,19 | 0,32 | 0,27 | 0,030 | 0,15 | 0,28 | 0,18 | 0,17 | 0,19 | 0,23 |
| Acétate de méthyle | 0 | 1,22 | 0,32 | 0,20 | — | — | — | — | 0,225 | 0,060 | — | — | 0,055 | 0,040 | — | — | — | — | — | — |
| Acétate d'éthyle | 18 | 140 | 32 | 240 | 5 | 28,5 | 60 | 26 | 4 | 18,5 | 31 | 12 | 48 | 44 | 64 | 36 | 50 | 43 | 80 | 40 |
| Propionate d'éthyle | 0 | 0,030 | 0,080 | 0,082 | 0 | 0,240 | 0,090 | 0,260 | 0,025 | 0,215 | 0,40 | 0,19 | 0,325 | 0,445 | 0,195 | 0,370 | 3,25 | 5,05 | 0,320 | 1,15 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | 0 | 0,030 | 0,007 | 0,035 | 0 | 0,093 | 0,011 | 0,187 | 0,032 | 0,34 | 0,013 | 0,036 | 0,081 | 0,018 | 0,027 | 0,027 | 0,030 | 0,028 | 0,014 | 0,056 |
| Acétate de méthyl-2 propyle | 0 | 0,010 | 0,002 | 0,016 | 0 | 0,017 | 0,007 | 0 | 0 | 0,015 | 0 | 0,012 | 0,079 | 0,040 | 0,011 | 0,002 | 0,042 | 0,033 | 0,084 | 0,016 |
| Butyrate d'éthyle | 0 | 0 | 0 | 0,010 | 0 | 0,036 | 0,006 | 0,021 | 0,013 | 0,009 | 0,015 | 0,009 | 0,260 | 0,021 | 0,167 | 0,021 | 0,160 | 0,026 | 0,145 | 0,016 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle | | 0 | 0,0005 | 0,001 | 0 | 0,005 | 0 | 0,005 | 0,002 | 0,005 | 0 | 0 | 0,006 | 0,006 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Acétate de méthyl-3 butyle | 0 | 0,29 | 0,47 | 0,44 | 0,036 | 0,13 | 0,73 | 0,105 | 0 | 0 | 0,007 | 0,011 | 1,42 | 0,17 | 0,62 | 0,13 | 1,89 | 0,255 | 1,21 | 0,14 |
| Hexanoate d'éthyle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,085 | 0,10 | 0,62 | 0,12 | 1,01 | 0,20 | 0,72 | 0,16 | 1,04 | 0,21 | 0,34 | 0,2 |

* Le méthanol formé à partir du milieu synthétique provient d'impuretés du saccharose utilisé.

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Nous avons en outre remarqué que les esters ont tendance à être formés en quantité plus importante en anaérobiose ; ce phénomène se retrouve dans le cas de **Saccharomyces oviformis** pour le butyrate d'éthyle, l'acétate de méthyl-3 butyle et l'hexanoate d'éthyle ; par contre, le propionate d'éthyle est toujours plus important en aérobiose. Pour les alcools supérieurs il semble y avoir, en moyenne, une légère augmentation en aérobiose ; cette constatation est en désaccord avec celle faite par PEYNAUD et GUIMBERTEAU (107) qui observent une augmentation du méthyl-2 propanol-1 ainsi que de la somme des alcools méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1 en anaérobiose.

c) **Formation des substances volatiles, au cours de la fermentation, en fonction du degré alcoolique.** — Afin d'étudier la formation des substances volatiles au cours de la fermentation, nous avons préparé la solution synthétique décrite au début de ce chapitre et contenant 180 g/l de saccharose ; nous l'avons répartie par volumes de 600 $cm^3$, dans des bouteilles de 750 $cm^3$. Les échantillons ont été ensemencés pour moitié par une culture pure de **Saccharomyces oviformis,** et par **Saccharomyces ellipsoideus** pour l'autre moitié en ayant soin de mettre le même volume de levain dans chaque cas. La fermentation s'est déroulée à 25 °C dans des conditions de semi-aérobiose (bouteilles bouchées par un tampon d'ouate stérile). Nous n'avons pas rapporté les valeurs trouvées à la quantité de sucre consommée, comme cela se fait d'habitude, mais à la quantité d'alcool formé, qui est dosée par injection directe, dans le chromatographe, en même temps que les alcools supérieurs et l'acétate d'éthyle. La concentration des autres esters a été déterminée par extraction par l'azote. Nous avons reporté les résultats obtenus pour **Saccharomyces ellipsoideus** dans le tableau XX et pour **Saccharomyces oviformis** dans le tableau XXI ; nous donnons également les courbes représentant la variation du méthyl-3 butanol-1 et du méthyl-2 propanol-1 (fig. 18) et de quelques esters (fig. 19) en fonction du degré alcoolique. Ces résultats montrent que la formation du méthyl-3 butanol-1 ainsi que celle du méthyl-2 propanol-1 est proportionnelle à celle de l'éthanol ; il en est de même pour le méthyl-2 butanol-1, par contre le propanol-1 est formé, essentiellement, au début de la fermentation.

En ce qui concerne les esters, l'acétate d'éthyle et le propionate d'éthyle ont une concentration proportionnelle à la quantité d'alcool formée ; le formiate d'éthyle, le butyrate d'éthyle et l'hexanoate d'éthyle sont formés au début de la fermentation, enfin, l'acétate de méthyl-3 butyle diminue en fin de fermentation (fig. 19). Nos expériences confirment les résultats déjà acquis en ce qui concerne les alcools supérieurs (86, 99,

## TABLEAU XX

**Formation des substances volatiles, au cours de la fermentation, en fonction du degré alcoolique (Sacch. ellipsoideus)**

| Ethanol | 0°6 | 3°6 | 5°7 | 6°9 | 8°1 | 9°1 | 9°7 | 11°3 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Propanol-1 ..... | 3 | 14 | 18,5 | 19,5 | 21 | 23 | 23 | 31 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 4 | 7 | 10 | 16,5 | 20 | 22 | 18,5 | 30 |
| Méthyl-2 butanol-1 .. | 1,5 | 5 | 8,5 | 18 | 16 | 25 | 16 | 26 |
| Méthyl-3 butanol-1 .. | 11 | 32 | 40 | 80 | 64 | 70 | 81 | 98 |
| Formiate d'éthyle ... | — | — | — | 0,10 | 0,11 | 0,09 | 0,11 | 0,12 |
| Acétate d'éthyle .... | 0,7 | 4,5 | 6,8 | 12,5 | 12 | 31 | 28 | 33 |
| Propionate d'éthyle . | — | 0,06 | 0,12 | 0,18 | 0,73 | 0,80 | 1,18 | 0,82 |
| Butyrate d'éthyle ... | — | 0,03 | 0,07 | 0,10 | 0,11 | 0,10 | 0,17 | 0,12 |
| Acétate de méthyl-3 butyle ..... | — | 0,49 | 0,48 | 0,57 | 0,49 | 0,37 | 0,75 | 0,35 |
| Hexanoate d'éthyle . | — | 0,20 | 0,18 | 0,20 | 0,20 | 0,17 | 0,16 | 0,21 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

## TABLEAU XXI

**Formation des substances volatiles, au cours de la fermentation, en fonction du degré alcoolique (Sacch. oviformis)**

| Ethanol | 1°7 | 3°1 | 6°7 | 8°7 | 9°3 | 11°4 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Propanol-1 ..... | 8,5 | 16 | 22 | 34 | 28 | 32 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 5 | 7 | 10 | 15 | 16 | 19 |
| Méthyl-2 butanol-1 .. | 2,5 | 6 | 11 | 17 | 17 | 20 |
| Méthyl-3 butanol-1 .. | 14,5 | 30 | 70 | 88 | 66 | 87 |
| Formiate d'éthyle ... | — | 0,15 | 0,10 | 0,14 | 0,10 | 0,15 |
| Acétate d'éthyle .... | 2,2 | 4 | 14 | 22 | 28 | 35 |
| Propionate d'éthyle . | — | 0,20 | 0,28 | 0,42 | 0,50 | 0,73 |
| Butyrate d'éthyle ... | 0,01 | 0,06 | 0,02 | 0,17 | 0,06 | 0,17 |
| Acétate de méthyl-3 butyle ..... | 0,10 | 0,35 | 0,85 | 0,83 | 0,72 | 0,38 |
| Hexanoate d'éthyle . | 0,05 | 0,14 | 0,20 | 0,20 | 0,21 | 0,26 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

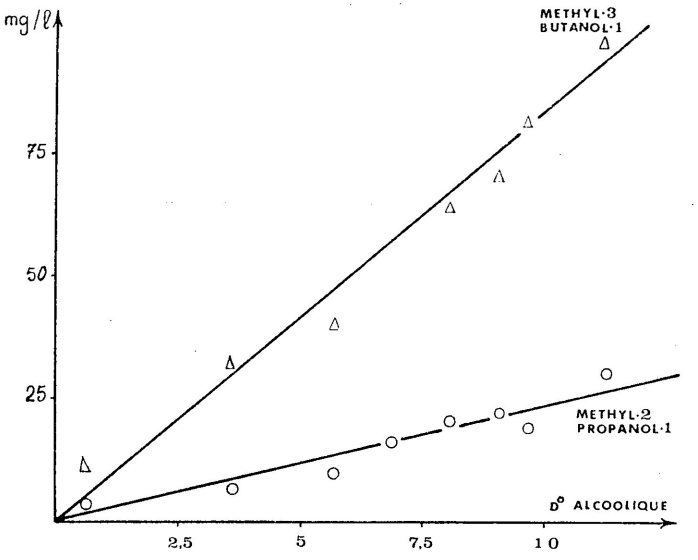



Fig. 18. - Variations des concentrations du méthyl-3 butanol-1 et du méthyl-2 propanol-1 en fonction du degré alcoolique (Sacch. ellipsoïdeus).

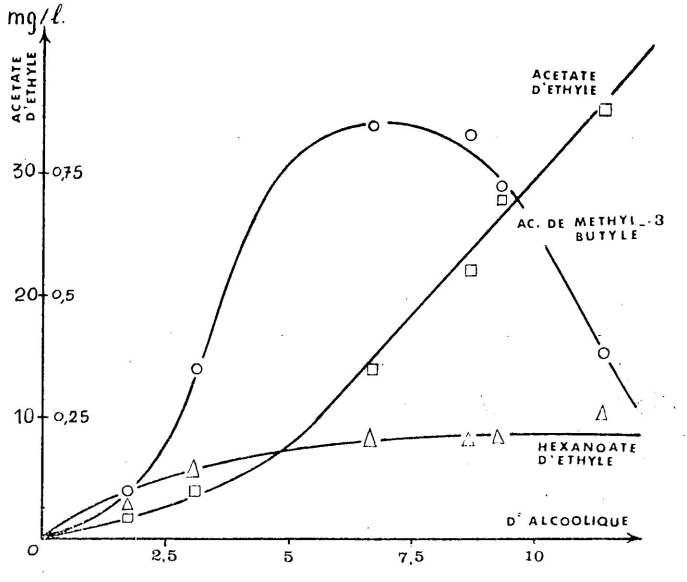



Fig. 19. - Variations des concentrations de quelques esters en fonction du degré alcoolique (Sacch. oviformis).

107-111) ; par contre, pour les esters très volatils, seul à notre connaissance, NORDSTRÖM (79, 112) a fait une étude quantitatitve de leur formation à partir des acides gras volatils. Les résultats obtenus, en ce qui concerne les esters volatils, semblent prouver qu'ils ont plusieurs modes de formation. En effet, même si la diminution de la concentration de l'acétate de méthyl-3 butyle, en fin de fermentation, est due à un entraînement par le gaz carbonique de fermentation, il devrait en être de même pour les autres esters, ce qui n'est le cas, ni pour l'acétate d'éthyle, ni pour l'hexanoate d'éthyle. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux qui se sont dégagés lors des fermentations aérobies et anaérobies, où on a observé une augmentation du propionate d'éthyle en aérobiose, alors que c'est en anaérobiose, que les autres esters sont les plus importants.

3° ETUDE DE QUELQUES VINS.

a) **Comparaison de quelques vins blancs de modes de vinification différents.** — Un moût de raisins blancs (Merlot + Sémillon + Sauvignon) a été divisé en quatre lots traités de manières différentes :

— 1er lot débourdé statiquement après addition de 100 mg/l d'anhydride sulfureux.

— 2e lot centrifugé de manière à éliminer les bourbes sans nécessiter d'addition d'anhydride sulfureux.

— 3e lot maintenu à 15 °C pendant la fermentation qui a duré environ six semaines.

— 4e lot, témoin, fermenté à 22 °C environ, sans débourbage.

La fermentation a eu lieu dans des fûts de 50 litres en acier inoxydable.

Une dégustation immédiatement après la fin de la fermentation a montré que, dans cette expérience, le témoin était alors le meilleur, suivi de l'échantillon fermenté à 15 °C.

Nous avons dosé les substances volatiles de ces quatre vins suivant la méthode habituelle ; les résultats, reportés dans le tableau XXII, conduisent aux observations suivantes :

TABLEAU XXII

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en blanc**

| | Témoin | Débourbé | Centrifugé | Fermenté à 15 °C |
|---|---|---|---|---|
| Ethanol ..... | 13° | 13° | 13° | 13° |
| Méthanol ..... | 40 | 40 | 42 | 55 |
| Propanol-1 ..... | 25 | 23 | 17 | 30 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 110 | 68 | 48 | 94 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 56 | 25 | 22 | 45 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 162 | 77 | 70 | 122 |
| Formiate d'éthyle ..... | 0,044 | 0,065 | 0,041 | 0,043 |
| Acétate de méthyle ..... | 0,030 | 0,029 | 0,021 | 0,057 |
| Acétate d'éthyle ..... | 44 | 56 | 56 | 51 |
| Propionate d'éthyle ..... | 0,09 | 0,32 | 0,43 | 0,34 |
| Acétate de propyle ..... | 0,018 | 0,035 | 0,035 | 0,031 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 0,049 | 0,034 | 0,026 | 0,022 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 0,15 | 0,21 | 0,20 | 0,18 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 0,12 | 0,25 | 0,33 | 0,24 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 1,6 | 2,2 | 3,1 | 2,0 |
| Hexanaote d'éthyle ..... | 0,10 | 0,37 | 0,57 | 0,31 |
| Acétate d'hexyle ..... | 0 | 0,10 | 0,21 | 0,06 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

— Le méthanol est nettement plus important dans l'échantillon fermenté à 15 °C ; ceci tient sans doute au fait que la fermentation ayant été plus longue, l'hydrolyse des pectines a été plus importante.

— Les alcools supérieurs des échantillons débourbés sont nettement moins importants ; ceci prouve une intervention des bourbes dans la formation de ces corps.

— Les différences entre les esters volatils des quatre échantillons sont faibles ; le témoin en contient un peu moins, en particulier en ce qui concerne l'acétate d'éthyle et le propionate d'éthyle.

La conclusion de cette expérience semble être que la qualité est liée à la teneur en alcools supérieurs et est inversement proportionnelle à la teneur en esters volatils.

b) **Comparaison de quelques vins rouges de modes de vinification différents.**

TABLEAU XXIII

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en rouge**

| | Macération classique | | Macération carbonique | |
|---|---|---|---|---|
| | 4 jours | 7 jours | 4 jours | 7 jours |
| Ethanol | 12° | 12° | 12° | 12° |
| Méthanol | 63 | 64 | 80 | 81 |
| Propanol-1 | 11,5 | 10 | 14 | 18 |
| Méthyl-2 propanol-1 | 73 | 75 | 74 | 74 |
| Méthyl-2 butanol-1 | 82 | 82 | 82 | 82 |
| Méthyl-3 butanol-1 | 193 | 196 | 196 | 196 |
| Formiate d'éthyle | 0,10 | 0,10 | 0,12 | 0,10 |
| Acétate de méthyle | 0,110 | 0,084 | 0,076 | 0,085 |
| Acétate d'éthyle | 32 | 33 | 40 | 41 |
| Propionate d'éthyle | 0,078 | 0,150 | 0,074 | 0,082 |
| Acétate de propyle | 0,012 | 0 | 0,006 | 0,009 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | 0,054 | 0,039 | 0,054 | 0,035 |
| Acétate de méthyl-2 propyle | 0,023 | 0,080 | 0,034 | 0,041 |
| Butyrate d'éthyle | 0,090 | 0,104 | 0,078 | 0,104 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,003 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0,008 | 0,003 | 0,007 | 0,005 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,076 | 0,061 | 0,056 | 0,084 |
| Hexanoate d'éthyle | 0,130 | 0,060 | 0,070 | 0,09 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

— **Influence de la macération carbonique.** — Cette expérience de vinification a été réalisée dans une cave coopérative, donc dans des cuves classiques ; on compare quatre échantillons, 2 correspondant à une macération classique de 4 jours et de 7 jours, 2 correspondant à une macération carbonique.

Les substances volatiles ont été déterminées, soit par injection directe pour les alcools, soit après extraction pour les esters.

Les résultats reportés dans le tableau XXIII, conduisent aux observations suivantes :

— En ce qui concerne les alcools, nous observons que le méthanol et le propanol-1 sont plus importants dans les vins issus de macération carbonique. On peut expliquer l'augmentation du méthanol par une macération plus efficace, donc une meilleure diffusion des matières pectiques dans le jus.

— Le taux d'acétate d'éthyle suit les mêmes variations de concentration que le méthanol et semble indépendant du temps de macération, alors que le propionate d'éthyle et le butyrate d'éthyle augmentent. En ce qui concerne les autres esters, on ne note pas de différences significatives.

— **Vinification continue.** — Cette expérience a été réalisée sur des vins provenant de caves coopératives, dans lesquelles une partie de la vendange a été vinifiée de façon classique et une autre dans un vinificateur

TABLEAU XXIV-A

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en rouge**

| | Vinification classique | | | Vinification continue | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | A | B | C |
| Acétate d'éthyle .... | 28 | 24 | 23 | 26 | 26 | 23 |
| Méthanol ..... | 150 | 133 | 144 | 110 | 91 | 100 |
| Propanol-1 ..... | 17 | 16 | 17 | 16 | 16 | 16 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 96 | 116 | 86 | 50 | 65 | 50 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 .. | 245 | 257 | 240 | 245 | 212 | 195 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

TABLEAU XXIV-B

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en rouge**

| | Vinification classique | | | Vinification continue | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | C | A | B | C |
| Acétate d'éthyle .... | 37 | 37 | 36 | 29 | 35 | 29 |
| Méthanol ..... | 167 | 178 | 170 | 107 | 126 | 130 |
| Propanol-1 ..... | 14 | 17 | 17 | 14 | 15 | 17 |
| Méthyl-2 propanol-1 . | 76 | 71 | 68 | 68 | 53 | 45 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 .. | 275 | 245 | 240 | 300 | 255 | 240 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

TABLEAU XXIV-C

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en rouge**

| | Vinification classique | Vinification continue |
|---|---|---|
| Acétate d'éthyle ..... | 31 | 31 |
| Méthanol ..... | 143 | 114 |
| Propanol-1 ..... | 11 | 12 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 78 | 64 |
| Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1 ..... | 300 | 295 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

continu ; nous disposions de vins provenant de 3 caves coopératives que nous appellerons A, B et C ; les dosages ont été réalisés par injection directe sur colonne de Carb. 1540, les résultats ont été reportés dans les tableaux XXIV A. B. C.

La teneur en méthanol est plus faible dans les vins issus de vinificateurs continus (25 % en moyenne) ; cela vient sans doute du fait que le

temps de macération est généralement plus court dans le cas des vinifications continues que dans le cas d'une vinification classique.

La teneur en méthyl-2 propanol-1 est, elle aussi, plus faible dans le cas des vinificateurs continus, de 20 à 40 %, alors que les teneurs des autres alcools supérieurs sont sensiblement constantes ; PEYNAUD et GUIMBERTEAU (113) expliquent cette variation par l'apport journalier d'azote ammoniacal par la vendange fraîche, ce qui entraîne une modification dans l'utilisation des acides aminés, pour la formation des alcools supérieurs.

TABLEAU XXV

**Variation du taux des substances volatiles en fonction des méthodes de vinification en rouge Influence du chauffage de la vendange**

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| Ethanol ..... | 11°3 | 11°1 | 11°7 | 11°5 |
| Méthanol ..... | 148 | 167 | 104 | 120 |
| Propanol-1 ..... | 24 | 34,5 | 40 | 33,5 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 126 | 110 | 101 | 98 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 97 | 95 | 111 | 88 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 250 | 259 | 289 | 229 |
| Formiate d'éthyle ..... | 0,12 | 0,17 | 0,11 | 0,14 |
| Acétate de méthyle ..... | 0,14 | 0,15 | 0,11 | 0,11 |
| Acétate d'éthyle ..... | 55 | 84 | 51 | 60 |
| Propionate d'éthyle ..... | 0,25 | 0,23 | 0,24 | 0,24 |
| Acétate de propyle ..... | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,02 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 0,080 | 0,073 | 0,057 | 0,058 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 0,060 | 0,068 | 0,010 | 0,040 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 0,124 | 0,114 | 0,130 | 0,096 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0,010 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0,010 | 0,008 | 0,008 | 0,010 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,070 | 0,084 | 0,142 | 0,069 |
| Hexanoate d'éthyle ..... | 0,09 | 0,10 | 0,10 | 0,06 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

1 : témoin, vinification en rouge, sans $SO_2$.
2 : vendange chauffée à 90 °C par la vapeur d'eau.
3 : vendange chauffée après foulage à 70 °C.
4 : vendange non foulée, chauffée dans le surmaturateur.

— **Influence du chauffage de la vendange.** — Cette expérience a été réalisée à la Cave expérimentale de la Station Agronomique et Œnologique. Un premier lot de vendange rouge a été chauffé pendant 3 mn à 90 °C par de la vapeur d'eau (2), un deuxième lot a été porté pendant 30 mn à 70 °C dans un grand récipient après foulage (3), le troisième lot est resté trente-six heures à 40 °C dans un surmaturateur à air chaud (4) ; ces trois échantillons, ainsi que le témoin (1), ont ensuite été vinifiés en rouge. Les substances volatiles ont été dosées par chromatographie en phase gazeuse et les résultats reportés dans le tableau XXV. D'autre part, la dégustation a montré que l'échantillon chauffé à 70 °C était le meilleur, six mois après la vinification. Or le tableau XXV montre que cet échantillon (3) possède la plus forte teneur en alcools supérieurs, et la plus faible en acétate d'éthyle ; nous avons trouvé un résultat analogue pour des vins blancs de modes de vinification différents (chapitre VI, paragraphe 3, a) ; où, là encore, l'échantillon jugé le meilleur à la dégustation, possédait la plus forte teneur en alcools supérieurs.

TABLEAU XXVI

**Comparaison entre les teneurs en anthocyanes et en méthanol de vins issus de vendanges rouges chauffées**

| | Anthocyanes | Méthanol |
|---|---|---|
| Témoin ..... | 542 | 148 |
| Vendange chauffée à 90 °C. | 550 | 167 |
| Vendange chauffée à 70 °C | 490 | 104 |
| Vendange chauffée à 40 °C | 493 | 120 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Enfin, nous voudrions établir un parallèle entre la teneur en méthanol et le taux d'anthocyanes déterminé par MILHE (114). Il semble bien exister une analogie entre les teneurs de ces deux corps (tableau XXVI), ce qui paraît logique puisque les anthocyanes diffusent dans le jus à partir de la pellicule et que le méthanol provient de la dégradation des pectines venant, elles aussi, principalement de la pellicule.

c) **Comparaison de trois vins de Sauternes d'âges différents.** — Nous avons étudié les substances volatiles de trois vins de Sauternes de millésimes différents mais d'origine et de mode de vinification semblables.

Les résultats, reportés dans le tableau XXVII permettent certaines conclusions. Parmi les alcools, le méthanol, le propanol-1 et le méthyl-2 propanol-1 sont plus concentrés dans le vin de 1966. Pour les esters, ils sont moins concentrés dans le vin de 1967, mis à part l'hexanoate d'éthyle ; l'acétate de méthyl-3 butyle décroît régulièrement. Enfin on note la présence d'acétate de butyle, ce qui n'est pas général dans les vins que nous avons étudiés.

TABLEAU XXVII

**Dosage des substances volatiles dans des vins de Sauternes**

| Années | 1965 | 1966 | 1967 |
|---|---|---|---|
| Ethanol | 13°5 | 14°75 | 13°75 |
| Méthanol | 72,5 | 111,5 | 75,5 |
| Propanol-1 | 26 | 39 | 16,5 |
| Méthyl-2 propanol-1 | 119,2 | 181 | 49,3 |
| Méthyl-2 butanol-1 | 45 | 72 | 74 |
| Méthyl-3 butanol-1 | 141 | 207 | 213 |
| Formiate d'éthyle + acétate de méthyle | 0,28 | 0,31 | 0,13 |
| Acétate d'éthyle | 162 | 175 | 58 |
| Propionate d'éthyle | 0,24 | 0,27 | 0,11 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle | 0,54 | 0,60 | 0,07 |
| Acétate de méthyl-2 propyle | 0,12 | 0,13 | 0,03 |
| Butyrate d'éthyle | 0,21 | 0,25 | 0,11 |
| *Acétate de butyle | 0,032 | 0,026 | 0,001 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0,031 | 0,026 | 0,005 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,27 | 0,47 | 0,63 |
| Hexanoate d'éthyle | 0,24 | 0,25 | 0,22 |

Les chiffres représentent des mg/l.

* Nous avons considéré que ce corps, possédant à peu près le même temps de rétention que le méthyl-2 butyrate d'éthyle sur colonne ESD, avait aussi le même coefficient d'extraction.

d) **Comparaison de quelques vins blancs.** — Les vins étudiés dans ce paragraphe sont différents, aussi bien par les cépages dont ils sont issus que par les modes de vinification, le sucre résiduel et les pays d'origine (Allemagne, Autriche, Espagne, France, Italie, Suisse). Ce sont tous des vins de bonne qualité commerciale, mis en bouteilles depuis plus de six mois.

TABLEAU XXVIII

**Dosage des substances volatiles de quelques vins blancs d'origines différentes**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ethanol ..... | 13°7 | 12°4 | 11°5 | 12°8 | 12°4 | 12° | 13° | 15° | 13°6 |
| Méthanol ..... | 41 | 61 | 59 | 39 | 115 | 55 | 80 | 113 | 95 |
| Propanol-1 ..... | 36 | 34 | 30 | 24 | 34 | 29 | 39 | 45 | 25 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 93 | 96 | 80 | 50 | 71 | 55 | 89 | 60 | 93 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 82 | 43 | 32 | 33 | 36 | 29 | 46 | 44 | 65 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 258 | 157 | 107 | 132 | 121 | 73 | 127 | 139 | 213 |
| Formiate d'éthyle ..... | 0,840 | 0,050 | 0,053 | 0,067 | 0,072 | 0,051 | 0,035 | 0,052 | 0,066 |
| Acétate de méthyle ..... | — | — | — | — | 0,018 | 0,007 | 0,027 | 0,017 | 0,110 |
| Acétate d'éthyle ..... | 93 | 66 | 52,5 | 68 | 49 | 77 | 71 | 100 | 67 |
| Propionate d'éthyle ..... | 7,5 | 0,26 | 0,14 | 0,23 | 0,19 | 0,25 | 0,19 | 0,28 | 0,15 |
| Acétate de propyle ..... | — | 0,008 | 0,030 | 0,003 | 0,026 | 0,015 | 0,070 | 0,028 | 0,036 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 0,45 | 0,29 | 0,16 | 0,22 | 0,11 | 0,36 | 0,08 | 0,19 | 0,07 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 0,6 | 0,17 | 0,12 | 0,20 | 0,13 | 0,11 | 0,41 | 0,16 | 0,26 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 1,03 | 0,17 | 0,12 | 0,22 | 0,11 | 0,09 | 0,14 | 0,13 | 0,25 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0,022 | 0,009 | 0,004 | 0,004 | 0,003 | 0,014 | 0,003 | 0,006 | 0,004 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0,032 | 0,013 | 0,004 | 0,042 | 0,004 | 0,006 | 0,003 | 0,006 | 0,004 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,46 | 0,16 | 1,40 | 0,27 | 0,97 | 0,07 | 2,48 | 0,22 | 1,25 |
| Hexanoate d'éthyle ..... | 0,29 | 0,23 | 0,18 | 0,23 | 0,14 | 0,08 | 0,13 | 0,16 | 0,32 |
| Acétate d'hexyle ..... | 0 | 0 | 0,10 | 0 | 0,02 | 0 | 0,07 | 0 | 0,01 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

Nous leur avons attribué un numéro de 1 à 9 et nous les avons étudiés par chromatographie en phase gazeuse avec les méthodes décrites dans ce travail. Les résultats sont reportés dans le tableau XXVIII. Pour les alcools, la plus grande variation affecte le méthyl-3 butanol-1 puis le méthanol, dont les concentrations passent de 1 à 3. Parmi les esters, le vin n° 1, qui présente, à la dégustation, les caractères très marqués d'une piqûre lactique, possède une très importante quantité de propionate d'éthyle (30 fois plus que les autres) qui d'ailleurs masque l'acétate de propyle sur le chromatogramme ; le butyrate d'éthyle est cinq fois plus concentré que dans les autres vins, alors que l'acétate d'éthyle est peu supérieur à la moyenne. Nous notons encore que quatre vins sur neuf seulement (3, 5, 7, 9) possèdent une teneur élevée en acétate de méthyl-3 butyle ; ce sont aussi les seuls possédant de l'acétate d'hexyle en quantité appréciable. L'hexanoate d'éthyle, par contre, ne suit pas ces variations.

## CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons mis au point le dosage des alcools et des esters les plus volatils du vin, par chromatographie en phase gazeuse.

1° Nous avons été amené tout d'abord à mettre au point des colonnes spéciales telles que Carbowax 1540 et Carbowax 400 + Hallcomid M-18 OL ; ces colonnes permettent la séparation des substances volatiles du vin les plus concentrées.

2° Les alcools et l'acétate d'éthyle, toujours présents dans le vin à des concentrations supérieures à 10 mg par litre, peuvent être dosés par injection directe de 1 $mm^3$ de vin dans un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, de haute sensibilité.

3° Nous avons pu doser par injection directe, avec une précision de l'ordre de 3 %, dans une centaine de vins et de milieux synthétiques de fermentation :

— l'acétate d'éthyle ;
— le méthanol ;
— le propanol-1 ;
— le méthyl-2 propanol-1 ;
— le méthyl-2 butanol-1 ;
— le méthyl-3 butanol-1.

4° Pour doser les substances volatiles présentes dans le vin à faible concentration (inférieure à 1 mg/l), une méthode d'extraction et de concentration était nécessaire, la méthode mise au point consiste à entraîner, à 25 °C, les substances volatiles de 300 $cm^3$ de vin, par un courant d'azote et sous un vide partiel. Les substances volatiles sont recueillies dans des pièges réfrigérés. Les conditions optima d'extraction ont été déterminées expérimentalement. Cette méthode présente, sur l'extraction par solvant, l'avantage de ne pas introduire dans le vin de corps chimiques, difficiles à éliminer, qui généralement masquent les premiers pics du chromatogramme ; également elle ne nécessite pas de traitement thermique susceptible de créer des artéfacts.

5° Cette méthode nous a permis de mettre en évidence l'éther éthylique et le formiate de méthyle qui jusqu'alors n'avaient pas été signalés dans le vin.

6° L'alcool qui dilue les substances de l'extrait, influe sur l'extraction. Il est nécessaire d'opérer toujours à degré alcoolique constant (10°) et de repasser ensuite aux concentrations réelles, par application du coefficient de dilution.

7° L'extraction de solutions synthétiques, contenant, à des doses croissantes, les substances volatiles à étudier, nous a montré la proportionnalité de l'extraction en fonction de la concentration des substances ; par ailleurs, cette méthode d'extraction possède une bonne reproductibilité avec une erreur relative moyenne de l'ordre de 5 %. Nous avons donc pu déterminer des coefficients d'extraction, représentant le rapport entre les concentrations d'une même substance dans l'extrait et dans le vin ramené à 10° d'alcool. Les coefficients d'extraction des alcools varient de 7 à 15 ; ceux des esters sont plus élevés et varient de 260 à 730.

8° L'étude de milieux de fermentation dont la teneur en éthanol est inférieure à 10° nous a obligé à définir des coefficients d'extraction pour des degrés alcooliques variables (2°5 et 5°) ; en effet, l'addition d'alcool nécessaire pour obtenir des solutions à 10°, introduit des impuretés qui sont concentrées par l'extraction et risquent de fausser le dosage.

9° Nous pouvons désormais doser 18 substances volatiles contenues dans le vin ; nous avons rassemblé dans le tableau XXIX les doses limites de ces différentes substances que nous avons déterminées, dans le cas de vins blancs et de vins rouges, au cours de nos analyses.

10° En étudiant la formation de ces corps par fermentation de solutions synthétiques, nous avons observé que l'emploi de certains échantillons de saccharose, contenant des pectines, provoque l'apparition de méthanol au cours de la fermentation.

11° L'étude de la formation de ces produits par différentes souches de levures conduit aux conclusions suivantes :

— **Kloeckera apiculata** forme beaucoup d'esters volatils d'une part, des quantités équivalentes de méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1 d'autre part ; le rapport des concentrations de ces substances est normalement de 1/3 environ pour les autres souches.

TABLEAU XXIX

**Doses limites des substances volatiles présentes dans les vins étudiés**

| | Vins blancs | | | Vins rouges | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ethanol ..... | 11°5 | — | 15° | 11°3 | — | 13° |
| Méthanol ..... | 40 | — | 115 | 60 | — | 187 |
| Propanol-1 ..... | 25 | — | 45 | 11 | — | 40 |
| Méthyl-2 propanol-1 ..... | 50 | — | 95 | 45 | — | 126 |
| Méthyl-2 butanol-1 ..... | 30 | — | 80 | 60 | — | 110 |
| Méthyl-3 butanol-1 ..... | 75 | — | 260 | 150 | — | 290 |
| Formiate d'éthyle ..... | 0,02 | — | 0,20 | 0,03 | — | 0,20 |
| Acétate de méthyle ..... | 0,007 | — | 0,10 | 0,08 | — | 0,10 |
| Acétate d'éthyle ..... | 30 | — | 175 | 23 | — | 190 |
| Propionate d'éthyle ..... | 0,09 | — | 7,5* | 0,08 | — | 0,25 |
| Acétate de propyle ..... | 0,003 | — | 0,04 | 0 | — | 0,08 |
| Méthyl-2 propionate d'éthyle ..... | 0,02 | — | 0,30 | 0,03 | — | 0,40 |
| Acétate de méthyl-2 propyle ..... | 0,08 | — | 0,40 | 0,01 | — | 0,08 |
| Butyrate d'éthyle ..... | 0,10 | — | 1,00* | 0,08 | — | 0,17 |
| Méthyl-2 butyrate d'éthyle. | 0 | — | 0,02 | 0 | — | 0,08 |
| Méthyl-3 butyrate d'éthyle. | 0 | — | 0,03 | 0 | — | 0,09 |
| Acétate de méthyl-3 butyle. | 0,04 | — | 3,10 | 0.04 | — | 0,15 |
| Hexanoate d'éthyle ..... | 0,08 | — | 0,30 | 0,06 | — | 0,13 |

Les résultats sont exprimés en mg/l.

* Ces doses élevées ont été obtenues dans le cas d'un vin atteint de piqûre lactique.

— **Saccharomycodes ludwigii** forme une très importante quantité de méthyl-2 propanol-1.

— **Schizosaccharomyces liquefaciens** forme très peu d'alcools supérieurs.

— La formation de propionate d'éthyle est plus importante en aérobiose, alors que les autres esters sont formés préférentiellement en absence d'oxygène.

— Au cours de la fermentation alcoolique, le taux d'acétate de méthyl-3 butyle passe par un maximum puis décroît, l'hexanoate d'éthyle reste constant dès le premier tiers de la fermentation ; la formation des autres composés est à peu près proportionnelle à celle de l'alcool.

12° L'étude des substances volatiles de quelques vins rouges de modes de vinification différents montre que :

— la macération carbonique augmente la teneur en méthanol, en propanol-1 et en acétate d'éthyle.

— La vinification continue se traduit par une diminution de méthanol de 25 % et de méthyl-2 propanol-1 de 20 à 45 %.

— Le chauffage de la vendange, suivant différents modes opératoires, se traduit par une modification de la teneur en alcools supérieurs et en méthanol qui est en relation avec la variation de la teneur en anthocyanes.

13° En ce qui concerne les vins blancs, nous avons observé qu'un débourbage du moût se traduit par une diminution de la teneur en alcools supérieurs.

Nous devons remarquer que notre étude n'envisage pas la totalité des substances odorantes, puisqu'elle ne s'intéresse qu'aux composés les plus volatils. Cependant, il est reconnu que des substances telles que le lactate d'éthyle, l'hexanol, l'anthranilate de méthyle, le succinate de diéthyle, le phényl-2 éthanol ont une importance tout à fait primordiale sur l'arôme et les caractères organoleptiques des vins. Il faudra donc mettre au point de nouvelles méthodes qui permettront d'extraire ces substances du vin, de les séparer par chromatographie et de les doser.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


(1) BOIDRON J.N. — **Thèse doctorat 3e cycle,** 1966, Bordeaux.

(2) WEURMAN C. — **Café, cacao, thé,** 1963, **7,** 4, 341-346.

(3) WEURMAN C. — **Food Technol.,** 1961, **15,** 531.

(4) MACKAY D.A.M., LANG D.A. et BERDICK M. — **Anal. Chem.,** 1961, **33,** 369.

(5) KEPNER R.E., STRATING J. et WEURMAN C. — **J. Inst. Brew.,** 1963, **69,** 5, 399.

(6) HARRISON G.A.F. — **4th Wilkens Gas Chrom. Symp.,** 1966, ed. Van Swaay M., London Butterworth.

(7) HARRISON G.A.F., BYRNE W.J. et COLLINS E. — **J. Inst. Brew.,** 1965, **71,** 336.

(8) HARRISON G.A.F., BYRNE W.J. et COLLINS E. — **Proc. Eur. Brew. Conv.,** 1965, 352, Stockholm.

(9) MAULE D.R. — **J. Inst. Brew.,** 1967, **73,** 4, 351-361.

(10) KEPNER R.E., MAARSE H. et STRATING J. — **Anal. Chem.,** 1964, **36,** 1, 77-82.

(11) AURAND L.W., SINGLETON J.A., BELL T.A. et ETCHELLS J.L. — **J. Food. Sci.,** 1966, **31,** 2, 172-177.

(12) REYMOND D., MUEGGLER-CHAVAN F., VIANI R., VUATAZ L. et EGLI H. — **J. Gas Chrom.,** 1966, 28.

(13) RANKINE B.C. — Communication personnelle, 1967.

(14) DUBOIS J. — Communication personnelle, 1967.

(15) LEMPERLE E. et MECKE R. — **Die Weinwissenschaft,** 1964, **19,** 210-213.

(16) LEMPERLE E. et MECKE R. — **Z. anal. Chem.,** 1965, **212,** 1, 18-20.

(17) BIDMEAD D.S. — **Recent advances in food science,** 1963, **3,** 158-164, ed. Muil Leitch J., London Butterworth.

(18) SHAPIRO J. — **Science,** 1961, **133,** 2063.

(19) RIBEREAU-GAYON P. — **Chim. anal.,** 1961, **43,** 161.

(20) ÄYRÄPÄÄ T. — **J. Inst. Brew.,** 1967, **73,** 17.

(21) HASHIMOTO N. et KUROIWA Y. — **J. Inst. Brew.,** 1966, **72,** 151.

(22) PRIBELA A. — **Biologia Esckoel,** 1965, **3,** 173.

(23) SUNDT E. et WINTER M. — **Helv. chim. Acta,** 1962, **45,** 2212.

(24) POTTERAT M. et GYGI R. — **Z. anal. Chem.,** 1966, **221,** 312-320.

(25) KEPNER R.E. et WEBB A.D. — **Amer. J. Enol.,** 1956, **7,** 8-18.

(26) WEBB A.D. et KEPNER R.E. — **Food Research,** 1957, **22,** 384-395.

(27) WEBB A.D. et KEPNER R.E. — **Amer J. Enol. Viticult.,** 1961, **12,** 51-59.

(28) HONKANEN E. et KARVONEN P. — **Act. Chem. Scand.,** 1963, **17,** 1357-1362.

(29) STEVENS K.L., BOMBEN J., LEE A. et Mc FADDEN W.H. — **J. agr. Food Chem.,** 1966, **14,** 3, 249-252.

(30) STEVENS K.L., BOMBEN J. et Mc FADDEN W.H. — **J. agr. Food Chem.,** 1967, **15,** 3, 378-380.

(31) STRATING J. et VENEMA A. — **J. Inst. Brew.,** 1961, 525.

(32) AHRENST-LARSEN B. et LEVIN HANSEN H. — **Wallerstein Lab. Communic.,** 1964, **92,** 41-49.

(33) VAN GHELUWE J.E.A., BELLEAU G., JAMIESON A. et BUDAY A. — **Amer. Soc. brew. Chemists Proc. annu. Meetg.,** 1967, 49-57.

(34) VAN DER KLOOT A.P. et WILCOX F.A. — **Amer. Soc. brew. Chemists Proc., annu. Meetg.,** 1963, 93.

(35) HERZ K.O. et CHANG S.S. — **J. Food Sci.,** 1966, **31,** 937-940.

(36) WEURMAN C. — **J. Food Sci.**, 1961, **26**, 670-672.

(37) SHITO E., NYKÄNEN L. et SUOMALAINEN H. — **Teknillisen Kemian Aikekauslehti**, 1962, **19**, 752-762.

(38) WEBB A.D., KEPNER R.E. et IKEDA R.M. — **Anal. Chem.**, 1962, **24**, 1944.

(39) IKEDA R.M., WEBB A.D. et KEPNER R.E. — **J. agr. Food Chem.**, 1956, **4**, 355-363.

(40) PFENNINGER H. — **Z. Lebensmittel-Unters.u-Forsch.**, 1963, **120**, 2, 100.

(41) NAWAR W.W. et FAGERSON I.S. — **Anal. Chem.**, 1960, **32**, 11, 1534.

(42) NAWAR W.W., SAWYERS F.M., BELTRAN E.G. et FAGERSON I.S. — **Anal. Chem.**, 1960, **32**, 11, 1534.

(43) SWOBODA P.A.T. — **4th Smposium on gaz Chrom.**, 1962, 29, ed. Van Swaay M., London Butterworth.

(44) POLLARD A., KIESER M.E., STEVENS P.M. et TUCKNOTT O.G. — **J. Sci. Food Agric.**, 1965, **16**, 384-389.

(45) MABBITT L.A. et Mc KINNON G. — **J. Dairy Res.**, 1963, **30**, 359.

(46) MABBITT L.A. — **Recent advances in food science**, 1963, **3**, 185, ed. Muil Leitch J., London Butterworth.

(47) DRAWERT F. et BACHMANN O. — **Symposium fruchtaromen**, 1962, **4**, 235, ed. Juris Verlag Zurich.

(48) DRAWERT F. et RAPP A. — **Vitis**, 1966, **5**, 315-376.

(49) RANKINE B.C. — **J. Sci. Food Agric.**, 1963, **4**, 79-91.

(50) MONCRIEFF R.W. — **Foods**, 1955, **24**, 154-157.

(51) OUGH C.S. et AMERINE M.A. — **Amer. J. Enol.**, 1959, **10**, 1, 17-19.

(52) STRACKENBROCK K.H. — **Untersuchungen über apfel-aromen**, 1961, Doktorgrades dissertation Rheinischen Friedich Wilhelms-universität Bonn.

(53) PAILLARD N. — **Fruits,** 1965, **20,** 5, 189-197.

(54) KOMODA H., MANO F. et YAMADA M. — **J. agric. chem. Soc. Jap.,** 1967, **41,** 51.

(55) MEIGH D.G. — **J. Sci. Food Agric.** — 1956, **7,** 396-410.

(56) THOMPSON A.R. — **Austral. J. Sci. Res.,** 1951, **4 B,** 283.

(57) KOMODA H., MANO F. et YAMADA M. — **J. agric. chem. Soc. Jap.,** 1966, **40,** 127.

(58) KOMODA H., MANO F. et YAMADA M. — **J. agric. chem. Soc. Jap.,** 1966, **40,** 173.

(59) DRAWERT F. — **Vitis,** 1960, **2,** 172.

(60) DRAWERT F. — **Vitis,** 1962, **3,** 104.

(61) RHOADES J.W. — **Food Research,** 1958, **23,** 3, 254-261.

(62) AURAND L.W., SINGLETON J.A., BELL T.A. et ETCHELLS J.L. — **J. Food Sci.,** 1965, **30,** 2, 288-295.

(63) BERTRAND A., BOIDRON J.N. et RIBEREAU-GAYON P. — **Bull. Soc. Chim.,** 1967, **9,** 3, 149.

(64) HEINZ D.E., SEVENANTS M.R. et JENNINGS W.G. — **J. Food Sci.,** 1966, **31,** 1, 63, 69 et 81.

(65) FLATH R.A., BLACK D.R., GUADAGNI D.R., Mc FADDEN W.H. et SCHULTZ T.H. — **J. agr. Food Chem.,** 1967, **15,** 1, 29-35.

(66) KUTSCHER N. et STEUDEL F. — **Z. Physiol. Chem.,** 1903, **39,** 474.

(67) BOIDRON J.N. et RIBEREAU-GAYON P. — **Industr. aliment. agric.,** 1967, **84,** 6, 883-893.

(68) WEBB A.D., RIBEREAU-GAYON P. et BOIDRON J.N. — **C.R. Acad. Agric.,** 1963, 115-123.

(69) WEBB A.D., RIBEREAU-GAYON P. et BOIDRON J.N. — **Bull. Soc. Chim.,** 1964, 1415.

(70) MECKE R. et de VRIES M. — **Z. anal. Chem.,** 1959, **176,** 326-332.

(71) MECKE R., SCHINDLER R. et de VRIES M. — **Die Weinwissenschaft,** 1960, **25,** 123.

(72) MAARSE H. et ten NOEVER de BRAW M.C. — **J. Food Sci.,** 1966, **31,** 6, 951-955.

(73) LEMPERLE E. et MECKE R. — **Die Weinwissenschaft,** 1964, 570.

(74) PRILLINGER F., HORWATITSCH H. et MADNER A. — **Mitteilungen,** 1967, **17,** 271-279.

(75) PRILLINGER F. et MADNER A. — **Mitteilungen,** 1968, **18,** 1-9.

(76) BARAUD J. — **Bull. Soc. Chim.,** 1961, 1874.

(77) BARAUD J. et MAURICE A. — **Industr. aliment. agric.,** 1963, **3,** 7.

(78) FLANZY M. et JOURET C. — **Ann. Technol. agric.** 1963, **12,** 1, 39-50.

(79) NORDSTROM K. — **J. Inst. Brew.,** 1964, **70,** 41-55.

(80) PEYNAUD E. — **Rev. Viticult.,** 1937, **87,** 362-382.

(81) HENNIG K. et VILLFORTH F. — **Vorratspf. Lebensmitt.,** 1942, **5,** 181 et **7,** 313.

(82) VAN WYK C.J., WEBB A.D. et KEPNER R.E. — **J. Food Sci.,** 1967, **32,** 660-664 ; 664-668 ; 669-674.

(83) MATTHEWS J.S., Mc GREGOR D.R. et SUGISAWA H. — **J. Food Sci.,** 1962, **27,** 355.

(84) BAYER E. et BÄSSLER L. — **Z. anal. Chem.,** 1961, **181,** 418-424.

(85) de CLERK E. et DELAUNOY A. — **Bull. Ass. Roy. des Anc. Etud. en Brass. Louvain,** 1966, **1,** 1-8.

(86) SUOMALAINEN H. et NYKÄNEN L. — **Suomen Kemistil.,** 1964, **27,** 230-232.

(87) MEHLITZ A. et GIERSHNER K. — **Symposium Fruchtaromen** Berne, 1962, **4,** 301, ed. Juris Verlag Zurich.

(88) STERN D.J., LEE A., Mc FADDEN W.H. et STEVENS K.L. — **J. agr. Food Chem.,** 1967, **15,** 6, 1100-1103.

(89) POWELL A.D.C. et BROWN I.H. — **J. Inst. Brew.,** 1966, **72,** 261-265.

(90) FOUASSIN A. — **Rev. Ferment. Industr. Aliment.,** 1959, **14,** 206.

(91) DRAWERT F., HEIMANN W. et TSANTALIS G. — **Z. anal. Chem.,** 1967, **228,** 3, 170-180.

(92) SINGER D.D. et STILES J.W. — **Analyst,** 1965, **90,** 290-296.

(93) SINGER D.D. — **Analyst,** 1966, **91,** 127-134.

(94) DELUZARCHE A., MAILLARD A., MAIRE J.C., SOMMER J.M. et WAGNER M. — **Ann. Fals. Exp. Chim.,** 1967, **676,** 173-181.

(95) KABOT F.J. et ETTRE L.S. — **Perkin-Elmer Inst. News U.S.A.,** 1962, **4,** 13.

(96) PRILLINGER F. et HORWATITSCH H. — **Mitteilungen,** 1966, **16,** 1, 115-126.

(97) BERTRAND A. et BOIDRON J.N. — **Conn. Vigne Vin,** 1967, **2,** 51-54.

(98) BERTRAND A. et BOIDRON J.N. — **Conn. Vigne Vin,** (à paraître).

(99) OUGH C.S., GUYMON J.F. et CROWELL E.A. — **J. Food Sci.,** 1966, **4,** 620-625.

(100) TRANCHANT J. — **Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse,** 1964, 15, ed. Masson et C$^{ie}$, Paris.

(101) VAN DEEMTER J.J., ZUYDERWEG F.J. et KLINKENBERG A. — **Chem. Eng. Sci.,** 1956, **5,** 271.

(102) TRANCHANT J. — **Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse,** 1964, 104, ed. Masson et C$^{ie}$, Paris.

(103) ANDRE L. — **Ann. Technol. agric.,** 1965, **15,** 2, 159-179.

(104) RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — **Analyse et contrôle des vins,** 1958, 272, ed. Béranger, Paris.

(105) RIBEREAU-GAYON J. et PEYNAUD E. — **Analyse et contrôle des vins,** 1958, 263, ed. Béranger, Paris.

(106) LAFON-LAFOURCADE S. — Communication personnelle, 1967.

(107) PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G. — **Ann. Technol. agric.**, 1962, **11**, 2, 805.

(108) VAN ZYL J.A., VRIES M.J. et ZEEMAN A.S. — **S.-afr.T. Landbouwet**, 1961, **6**, 1, 165-179.

(109) CROWELL E.A. et GUYMON J.F. — **Amer J. Enol. Viticult.**, 1963, **14**, 4, 214-222.

(110) SUOMALAINEN H. — **J. Inst. Brew.**, 1966, **5**, 479.

(111) YOSHIZAWA K., FURUKAWA T., TADENUMA M. et YAMADA M. — **Agric. biol. Chem., Jap.**, 1961, **25**, 4, 326-332.

(112) NORDSTRÖM K. — **J. Inst. Brew.**, 1966, **72**, 38-40.

(113) PEYNAUD E. et GUIMBERTEAU G. — **Conn. Vigne Vin**, 1967, **1**, 3, 128-157.

(114) MILHE J.C. — Communication personnelle, 1968.

(115) SAPIS J.C. — **Thèse Doctorat 3e cycle**, 1967, Bordeaux.