ETUDE DES SUBSTANCES COMBINANT L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES VINS *

J.C. SAPIS et E. PEYNAUD
Station Agronomique et Œnologique de Bordeaux,
Institut d'Œnologie, Institut National de la Recherche Agronomique.

INTRODUCTION

L'importance du problème de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins a suscité de nombreux travaux sur la recherche et l'identification des substances responsables de cette combinaison. Si l'on connaît aujourd'hui un certain nombre de substances susceptibles, avec une importance variable, d'être à l'origine de ce phénomène, il arrive que dans certains cas, en particulier pour les moûts et les vins provenant de vendanges pourries, l'anhydride sulfureux reste pour une grande part combiné à des substances non identifiées. BLOUIN (1966), tentant d'établir quelques bilans de combinaison, note que, en moyenne, 40 p. 100 de l'anhydride sulfureux reste engagé dans des composés inconnus. BURROUGHS et SPARKS (1964 b), de la section Cidres et Jus de Fruits, Station de recherches de Long Ashton, Angleterre, se sont attachés à l'étude des substances combinant l'anhydride sulfureux dans les cidres et les jus de pomme. Nous avons utilisé leurs méthodes pour étudier le même problème dans les vins.

Notre travail comporte deux parties. La première est consacrée à l'étude qualitative des substances combinant l'anhydride sulfureux ; on fait passer l'échantillon de vin sur une colonne échangeuse d'anions sous forme bisulfite ; les substances, fractionnées par élution de gradient, sont identifiées par chromatographie sur papier ou sur couche mince.

La seconde partie est consacrée à une étude quantitative du problème ; nous avons tenté d'établir un bilan de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans le vin étudié par comparaison de la courbe de combinaison expérimentale et de la course de combinaison théorique établie par calcul.

* Ce travail a été effectué dans le cadre des conventions de recherches avec le Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux et avec l'appui de cet organisme.

I. - ETUDE QUALITATIVE

A. - FRACTIONNEMENT ET IDENTIFICATION DES SUBSTANCES COMBINANT L'ANHYDRIDE SULFUREUX.

1° - Principe de la séparation :

Les substances présentes dans le vin et combinant l'anhydride sulfureux sont fixées sur colonne échangeuse d'anions et fractionnées par élution de gradient au moyen d'une solution de bisulfite de sodium (BURROUGHS et SPARKS, 1964 b).

2° - Appareillage (figure 1) :

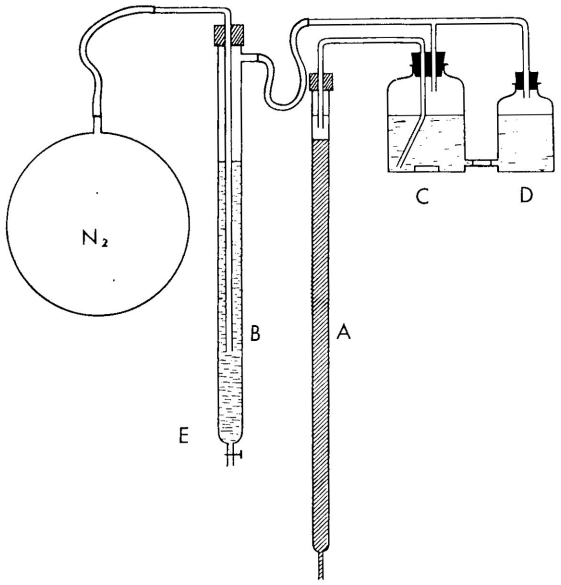


Fig. 1 — Appareillage pour la séparation des substances combinant l'anhydride sulfureux par chromatographie sur colonne.

Les composants essentiels de l'appareillage utilisé sont les suivants :

— une colonne A longue et étroite (75 cm de longueur environ de 0,8 cm de diamètre) servant à la chromatographie ;

— un système régulateur de pression destiné à régulariser la vitesse de passage du liquide à travers la colonne à chromatographie. Celui-ci est constitué d'un long tube de large diamètre B (75 cm de long, 1,5 cm de diamètre) en partie rempli d'eau et à l'intérieur duquel coulisse un

tube t ce qui permet de régler avec précision le débit de l'élution de la colonne A ;

— deux flacons C et D, le premier de 500 ml, l'autre de 250 ml reliés par un tube capillaire ; les flacons, destinés à l'élution de gradient, contiennent respectivement une solution à 20 p. 100 de métabisulfite de sodium (flacon D) et de l'eau distillée (flacon C).

— un collecteur de fractions dont le mécanisme comporte un dispositif photoélectrique compteur de gouttes.

3° - Préparation de la colonne à chromatographie :

On traite environ 40 g de résine DOWEX 1 (200 - 400 mesh, forme chlorure) par une solution de métabisulfite de sodium à 20 p. 100 ; on suit la préparation de la colonne (passage de la forme Cl à la forme HSO_3) en ajoutant à 1 ml d'éluat quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent et en comparant à un témoin car le métabisulfite de sodium utilisé est susceptible de contenir des chlorures comme impuretés.

Il faut environ 500 ml de solution de métabisulfite de sodium à 20 p. 100 ce qui nécessite environ 48 heures. La résine est ensuite versée dans la colonne à chromatographie et lavée avec 500 ml d'eau distillée.

4° - Application de l'échantillon de vin :

On prélève 10 ml de vin au moyen d'une pipette à un trait que l'on fixe au sommet de la colonne à chromatographie par un bouchon troué ; après passage du vin, on lave la colonne par 500 ml d'eau distillée. On élimine ainsi les sucres, substances peu intéressantes à la fois par leur faible pouvoir de combinaison du SO_2 et par leur grande quantité qui risque de perturber la séparation des composés.

5° - Elution de la colonne :

On prépare le collecteur de fractions en réglant le volume d'éluat à collecter par chaque tube à 60 gouttes (environ 5,7 ml) ; la vitesse d'élution doit être comprise entre 1 goutte toutes les 20 secondes (élution lente) et 1 goutte toutes les 15 secondes (élution rapide) ; cette vitesse d'élution est réglée au moyen de l'appareillage régulateur. Le flacon C (500 ml) contient de l'eau distillée, le flacon D(250 ml) une solution à 20 p. 100 de métabisulfite de sodium. On ouvre la communication entre les deux flacons en desserrant la pince de Mohr qui ferme le capillaire et on règle de débit d'élution à la cadence d'environ 1 goutte toutes les 18 secondes.

6° - Analyse des fractions :

On détermine, sur chaque fraction, la teneur en SO_2 combiné en suivant le protocole ci-après :

— On prend 1 ml d'éluat dans lequel on ajoute 10 ml d'une solution de HCl dilué au quart et 2 gouttes d'une solution d'empois d'amidon ; on oxyde l'excès de SO_2 par une solution d'iode un peu concentrée (environ N par exemple).Le point exact de virage de l'empois d'amidon est obtenu au moyen d'une solution d'iode 0,005 N. On amène alors le milieu aux environs de pH 8 en ajoutant la quantité suffisante de bicarbonate de sodium et on titre le SO_2 combiné par une solution d'iode 0,005 N.

7° - Chromatogramme :

On porte en abscisses le nombre de fractions et en ordonnées le volume de solution d'iode 0,005 N versé correspondant à chaque fraction ; le chromatogramme obtenu est représenté par la figure 2. On peut distinguer cinq pics.

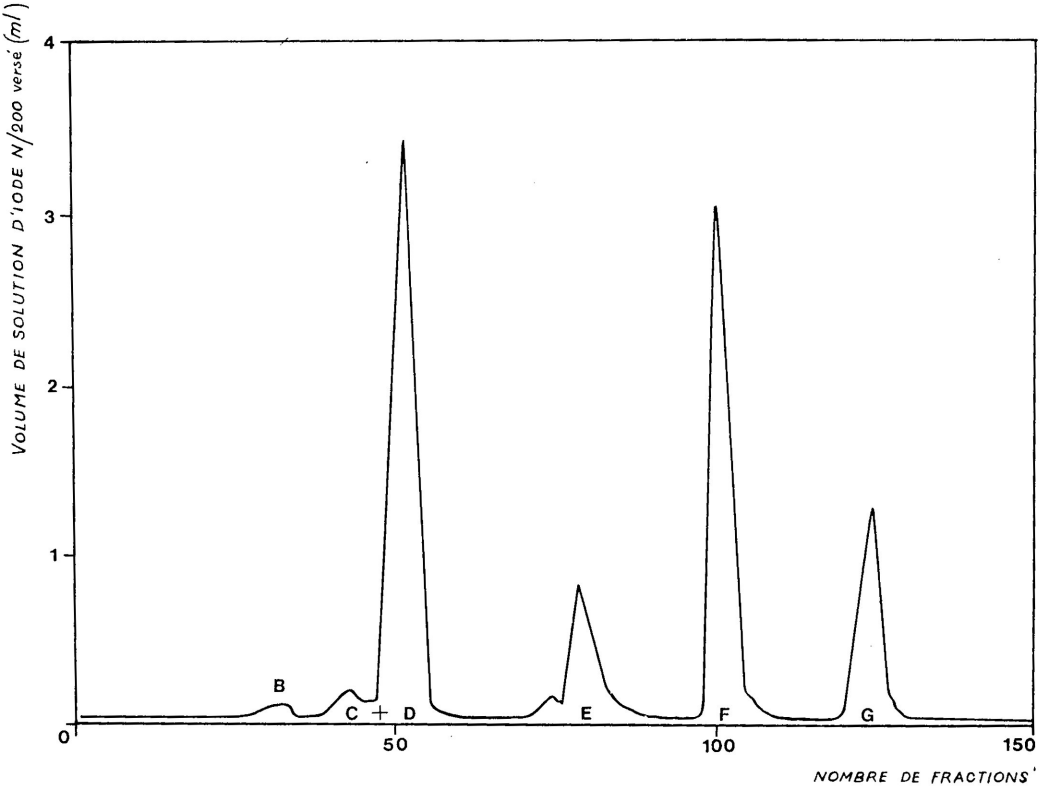


Fig. 2 — Chromatogramme des substances séparées sur colonne et combinant le SO_2.

Pic B (de la fraction 29 à la fraction 36) : Ce n'est pas un pic à proprement parler, plutôt un épaulement plus ou moins bien distinct de la ligne de base qui s'élève légèrement ; il correspond au céto-5 fructose, présent ici à faible concentration ; BURROUGHS et SPARKS ont montré que cette substance présente en très faible quantité dans les cidres provenant de fruits sains, possède un pic très important dans le cas de chromatogrammes de cidres provenant de fruits pourris.

Pic C +D (de la fraction 37 à la fraction 56) : Ce pic est composé de deux parties : le pic C, assez mal séparé et qui est celui de la xylosone et le pic D, bien séparé et très important ; celui-ci correspond à l'acétaldéhyde ; ce pic contient également l'acide céto-2 gluconique, principalement dans le cas de cidres provenant de fruits pourris ; dans le cas de cidres issus de fruits sains cet acide n'est présent qu'à très faible concentration.

Pic E (de la fraction 69 à la fraction 86) : Ce pic, beaucoup plus petit que le pic D est celui de l'acide galacturonique ; il est parfois assez mal séparé car c'est dans cette région que sortent, en même temps, les acides tartrique. malique et citrique.

Pic F (de la fraction 94 à la fraction 110) : Ce pic, important et bien séparé, correspond à l'ensemble acide pyruvique + acide dicéto 2,5 gluconique.

Pic G (de la fraction 121 à la fraction 132) : Ce pic est celui de l'acide α-cétoglutarique. Il est intéressant de noter qu'il n'est pas possible de mettre en évidence d'autres pics après celui-ci (afin de nous en assurer nous avons prolongé l'élution jusqu'au tube n° 190) même en employant une solution concentrée de métabisulfite de sodium. Il est donc peu probable que d'autres substances, présentes en quantités appréciables, soient susceptibles de rester fixées sur la colonne. BURROUGHS et SPARKS (1964 b) l'ont montré sur les cidres en recherchant ces substances dans les eaux de lavage des percolats d'où elles sont totalement absentes. (Dans le cas des jus non fermentés, par contre, il est possible qu'une partie des sucres, notamment du glucose soit éluée et perdue au cours du lavage de la colonne).

B. - ETUDE DES SUBSTANCES FRACTIONNEES

On rassemble dans un même flacon les fractions correspondant à chaque pic.

Tous les composés fractionnés sur colonne sont des substances à fonction carbonyle ; habituellement on les sépare et on les caractérise par chromatographie (chromatographie sur papier ou sur couche mince) après condensation avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine, sous forme de dinitro-2,4 phénylhydrazones. Cependant toutes les substances étudiées ici ne donnent pas de dérivés convenables avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine ; par contre, certains peuvent être identifés à l'état libre. Il importe donc de fractionner l'analyse de chaque éluat en deux parties :

— Une première partie est utilisée pour la préparation des dinitro-2,4 phénylhydrazones,

— Une deuxième partie est utilisée pour caractériser les composés à l'état libre.

Afin de préparer l'étude quantitative ultérieure, on amène la concentration en bisulfite de chacun des éluats correspondant à un pic à la valeur minimale de 0,4 M en ajoutant la quantité nécessaire de métabisulfite de sodium ; les substances présentes dans chaque éluat sont alors combinées en totalité avec le SO_2 présent en un large excès dont il faut se débarrasser ; pour cela on fait passer l'éluat à travers une colonne de résine Zéo-Karb 225 sous forme H^+ ; la résine fixe les ions Na^+ du métabisulfite de sodium et le SO_2 est enlevé en faisant le vide au fur et à mesure de son apparition ; ce traitement dure 30 minutes. On filtre. Le filtrat contient le (ou les) composé carbonylé sous forme de combinaison bisulfitique ainsi que, dans certains cas, sous forme libre (cela dépend de la constante de dissociation du composé carbonylé) ; il y a également dans le filtrat de l'acide sulfurique provenant de l'oxydation du SO_2.

Il est théoriquement possible qu'au cours de ce traitement certains composés carbonylés volatils soient perdus. Cependant, en ce qui concerne l'acétaldéhyde, substance particulièrement volatile, on a un composé remarquablement stable au pH acide où se trouve le milieu après passage sur Zéo-Karb 225 ; il est d'autre part peu probable que la désulfitation sous vide, même dans le cas où les combinaisons bisulfitiques d'autres composés carbonylés sont peut-être moins stables, puisse entraîner une dissociation appréciable.

1° - Préparation des dinitro-2,4 phénylhydrazones :

On prend 5 ou 10 ml d'éluat traité par la résine Zéo-Karb 225 et on dose sur cet échantillon le SO_2 combiné par l'iode 0,01 N. On ajoute une solution à 0,2 p. 100 de dinitro-2,4 phénylhydrazine en solution dans

H_2SO_4 N à la dose de 2 ml de solution par ml d'iode 0,01 N versé (il n'est pas besoin d'être très précis, l'essentiel étant d'avoir un excès de réactif). On ajoute la quantité suffisante d'acide sulfurique 4 N de façon à amener le milieu à environ 2 N en acide sulfurique. On attend une nuit ; on centrifuge, on sépare le précipité du surnageant ; on garde celui-ci particulièrement dans le cas des éluats correspondant aux pics F et G, acide pyruvique + acide dicéto-2,5 gluconique et acide α-cétoglutarique ; en effet, ces acides précipitent très peu en présence de dinitro-2,4 phénylhydrazine quand ils sont présents en faible quantité.

— Pics B (céto-5 fructose), C + D (xylosone + acétaldéhyde + acide céto-5 gluconique) et E (acide galacturonique).

On lave le culot, de couleur rouge orangé, avec H_2SO_4 2N puis avec H_2O et on le dissout dans l'acétate d'éthyle (ou le tétrahydrofurane) ; on sèche sur sulfate de sodium pendant une nuit ; on décante et on chromatographie.

— Pics F (acide pyruvique + acide dicéto-2,5 gluconique) et G (acide α-cétoglutarique).

Quand ces acides sont présents en faible quantité, ils précipitent très faiblement et restent, pour la plus grande part, en solution dans le surnageant. On les extrait par l'éther éthylique (3 fois 5 ml) ; les acides passent dans la phase éthérée qui prend une couleur jaune à cause de la présence d'un excès de réactif dont il faut se débarrasser. Pour cela on ajoute à l'éther une solution de carbonate de sodium à 10 p. 100 ; les acides salifiés passent dans la phase aqueuse, l'excès de réactif restant dans la phase éthérée. On élimine la phase supérieure et on réacidifie la phase aqueuse au moyen d'H_2SO_4 10 N jusqu'à pH 1. On procède alors à une dernière extraction de ces acides par un faible volume d'éther éthylique ; on sèche sur sulfate de sodium, on attend une nuit, on décante et on utilise pour la chromatographie.

On réalise en même temps un témoin que l'on chromatographie à côté des extraits des divers pics.

2° **Chromatographie des dinitro-2,4 phénylhydrazones**

La chromatographie des dinitro-2,4 phénylhydrazones ayant fait l'objet de très nombreux travaux, nous ne nous sommes pas attachés à étudier systématiquement toutes les variantes et tous les détails des diverses chromatographies. On utilise la chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Chromatographie des substances acides

Le solvant utilisé est le mélange chloroforme 25, acétate d'éthyle 20, acide propionique 5.

Substances témoins :
- Acide galacturonique : il migre très peu
- Acide pyruvique : spot net et bien séparé
- Acide dicéto-2,5 gluconique : il donne une série de spots mal séparés
- Acide α-cétoglutarique : spot net et bien séparé

Echantillons :
- Pic E Acide galacturonique : spot mal séparé du spot de départ
- Acide pyruvique
  - — précipité : pas de spot, ce qui prouve bien que l'acide pyruvique est totalement resté dans le surnageant
  - — surnageant : spot net et bien séparé
- Pic F
  - Acide dicéto 2,5 gluconique
    - — précipité : pas de spot comme dans le cas de l'acide pyruvique
    - — surnageant : mauvaise séparation avec plusieurs spots mal séparés et une importante traînée
- Pic G Acide α-cétoglutarique : spot net et bien séparé.

L'échantillon témoin donne, sur la ligne de départ, un spot qui est certainement un artefact et qui rend difficile l'identification de l'acide galacturonique.

S'il est donc possible d'identifier avec certitude l'acide pyruvique et l'acide α-cétoglutarique, l'identification de l'acide galacturonique et de l'acide dicéto 2,5 gluconique ne doit se faire qu'avec prudence.

Chromatographie des substances neutres

Le solvant utilisé est constitué par le mélange chloroforme 1, acétate d'éthyle 1.

Substances témoins :

- Acétaldéhyde : on obtient une mauvaise séparation avec plusieurs spots mal séparés
- Céto-5 fructose : spot net et bien séparé
- Xylosone : spot net et bien séparé (ce solvant est particulièrement recommandé pour la bonne séparation de la xylosone)

Echantillons :

- Pic B (céto-5 fructose) : on observe la série de spots correspondant au témoin ainsi qu'un léger spot de xylosone
- Pic C + D (xylosone + acétaldéhyde) : on observe deux spots correspondant à chaque substance, nets et bien séparés

On peut pulvériser sur le chromatogramme le mélange suivant : potasse 10 N, alcool éthylique 1 ; 1 de façon à différencier les monocarbonyles des dicarbonyles ; les premiers comme d'acétaldéhyde donnent un spot de couleur brune tandis que les dicarbonyles comme la xylosone, donnent un spot de couleur bleu de prusse.

3° **Préparation et chromatographie des composés carbonylés libres**

Avant de concentrer les éluats pour les chromatographier, il importe d'éliminer les traces d'acide sulfurique présent dans le milieu et provenant de l'oxydation du SO_2. On amène ainsi le pH aux environs de 7 ce qui permet la dissolution de la majeure partie des composés bisulfitiques.

Pour cela on ajoute une quantité suffisante de carbonate de baryum de façon à amener le pH de l'éluat aux environs de pH 7 ; on agite, on laisse reposer 10 minutes et on centrifuge ; on garde le surnageant, il contient en mélange les substances carbonylées libres acides et neutres ainsi qu'un large excès d'ions Ba^{++}.

Fractionnement des substances libres acides et des substances libres neutres. — Pour éliminer l'excès d'ions Ba^{++} on traite le surnageant par 1 g de résine Zéo-Karb 225 forme H^+. On procède alors au fractionnement : on fait passer le surnageant sur une colonne de résine Déacidite forme acétate ; les substances neutres passent dans l'éluat tandis que les substances acides restent fixées sur la colonne ; on les élue au moyen d'acide formique 6 N (6 à 7 ml). On évapore chaque éluat sous vide jusqu'à siccité et on les redissout dans 0,2 ml d'eau distillée.

Chromatographie des substances libres

On la réalise sur papier Whatman 1 dans les conditions suivantes :

Solvant : phénol-eau-acide formique
Révélateur : **p.** anisidine
Durée de développement : 12 heures

On possède 10 échantillons :

Pic B
- — fraction neutre : céto-5 fructose
- — fraction acide : néant

Pic C + D
- — fraction neutre : xylosone (très difficile à séparer par chromatographie sur papier)
- — fraction acide : acide céto-2 gluconique

Pic E
- — fraction neutre : néant
- — fraction acide : acide galacturonique

Pic F
- — fraction neutre : néant
- — fraction acide : acide pyruvique + acide dicéto-2,5 gluconique

(En réalité l'expérience montre que l'acide pyruvique est absent, probablement précipité par le carbonate de baryum ; de toutes façons la meilleure méthode d'identification consiste à préparer la dinitro-2,4 phénylhydrazone correspondante).

Pic G
- — fraction neutre : néant
- — fraction acide : acide α-cétoglutarique (en réalité il se pose le même problème que pour l'acide pyruvique, problème résolu de la même façon).

Chromatogramme n° 1 (figure 3 A)

Papier : Whatman 1
Solvant : phénol-eau-acide formique (300 g : 100 ml : 4 ml)
Révélateur : vert de bromocrésol

On chromatographie les 10 extraits et un témoin constitué par un mélange des acides tartrique, succinique, lactique, malique et citrique (B, C, D, E, F).

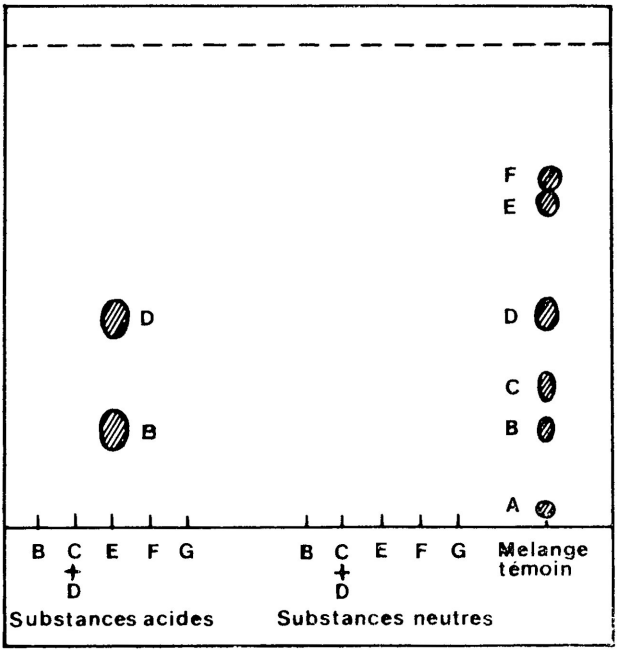


Fig. 3 A — Chromatogramme des acides tartrique et malique présents dans les extraits. (révélation par le vert de bromocrésol).
Mélange témoin : B Acide tartrique
C Acide citrique
D Acide malique
E Acide lactique
F Acide succinique

On remarque dans les substances acides :

— Dans l'extrait du pic E (acide galacturonique) une grande quantité d'acide malique et d'acide citrique ; ceux-ci gênent parfois au cours du fractionnement la bonne séparation de l'acide galacturonique ;

— On remarque dans le mélange témoin un spot bleu, de faible Rf (A). Il s'agit du spot du lithium, impureté présente dans l'acide succinique ; le baryum donne le même spot ; étant donné que, dans aucun des 10 extraits il n'y a ce spot on peut conclure que l'élimination des ions Ba^{++} a été totale.

Chromatogramme n° 2 (figure 3 B)

Papier Whatman 1
Solvant : phénol-eau-acide formique
Révélateur : **p**-anisidine

On chromatographie les 10 extraits et les substances témoins suivantes : xylosone, céto-5 fructose, acides céto-2 et dicéto-2,5 gluconiques et acide galacturonique. En outre, à titre documentaire, nous avons chromatographié les substances témoins suivantes : glucose, xylose, ribose, arabinose.

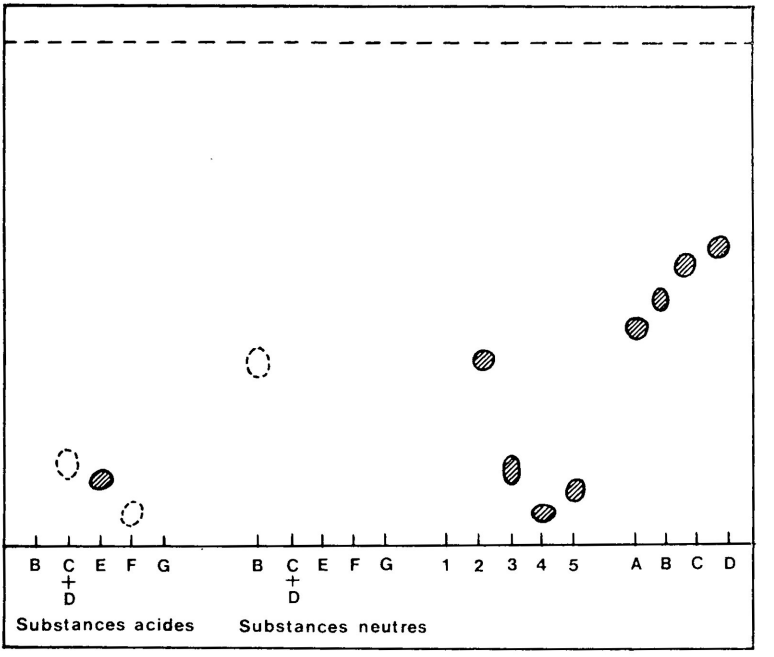


Fig. 3 B — Chromatogramme des substances neutres et acides à l'état libre combinant SO_2 (révélation par la p-anisidine)

Substances témoins : 1 xylosone
2 céto-5 fructose
3 acide céto-2 gluconique
4 acide dicéto-2,5 gluconique
5 acide galacturonique
A Glucose
B Xylose
C Arabinose
D Ribose

On remarque dans les extraits acides :

— un spot non identifiable dans l'extrait du pic C ; il s'agit probablement de l'acide céto-2 gluconique présent seulement à l'état de traces ;

— Dans l'extrait du pic E un spot net et bien séparé (Rf 0,18) qui est celui de l'acide galacturonique ;

— Dans l'extrait du pic F un spot d'intensité très faible dont le Rf correspond à celui de l'acide dicéto-2,5 gluconique (Rf 0,10).

Dans les extraits neutres :

— L'extrait du pic B donne un spot de faible intensité qui est celui du céto-5 fructose ;

— Dans l'extrait du pic E on devine des spots non identifiables.

On peut constater que le témoin de xylosone donne une traînée difficilement utilisable ; la xylosone normalement présente dans l'extrait du pic C n'apparaît pas ici à la révélation.

Révélation du chromatogramme par une solution d'iode

BURROUGHS et SPARKS (communication personnelle) ont tenté d'appliquer à la chromatographie qualitative le processus utilisé pour le dosage du SO_2 combiné, au moyen d'une solution d'iode et en présence d'empois d'amidon.

Le protocole de la révélation est le suivant : on vaporise sur le chromatogramme le mélange suivant :

— solution d'amidon à 1 p. 100 : 20 ml

— solution tampon à pH 7 : 5 ml

— solution de métabisulfite de sodium à 3 p. 100 : 5 ml

On sèche le chromatogramme très soigneusement et on acidifie le papier en le trempant dans un bain d'acide **o**-phosphorique (0,5 ml de H_3PO_4 dans 100 ml d'éther éthylique) ; on sèche, puis on humidifie le papier au moyen d'une solution hydro-alcoolique à 70 p. 100 en le plaçant dans une ventilation forcée pour enlever ainsi l'excès de SO_2. On sèche et on trempe le chromatogramme dans un bain d'iode (2,5 ml d'une solution d'iode 0,1 N dans 100 ml d'acétone) ; le papier vire au bleu foncé par suite de la réaction de l'iode avec l'amidon.

On pulvérise immédiatement une solution tampon à pH 6 (NaH_2PO_4 10 g, Na_2HPO_4 7,8 g, H_2O qsp 100). Les substances qui ont combiné le SO_2 apparaissent très nettement en blanc sur fond violet.

- **Substances témoins**
  - Céto-5 fructose : il apparaît assez nettement sous forme d'un spot de Rf 0,25
  - Xylosone : on obtient deux spots très allongés
  - Acide céto-2 gluconique : on a une traînée indistincte
  - Acide galacturonique : il n'apparaît pas ici, ce qui est très étonnant
  - Acide pyruvique : comme l'acide galacturonique il n'apparaît pas, ce qui est étonnant
  - Acide dicéto-2,5 gluconique : on a un spot net et bien séparé, de faible Rf (0,04)
  - Acide α-cétoglutarique : on obtient un spot très net (Rf 0,50)
- **Echantillons**
  - Extraits acides
    - Pic E : il n'apparait pas comme son témoin
    - Pic F : comme l'acide galacturonique il n'apparaît pas, ce qui est étontant
    - Pic G : on obtient un spot d'assez faible intensité dont le Rf correspond à l'acide α-cétoglutarique témoin.
  - Extraits neutres
    - Pic B : on a un spot très net qui est celui du céto-5 fructose
    - Pic C : la xylosone n'apparaît pas.

Bien que les résultats de cette méthode, encore expérimentale, de de révélation des composés combinant SO_2 ne semblent pas très satisfaisants, il serait intéressant de déterminer les meilleures conditions à employer : il est possible que ces mauvais résultats proviennent d'une insuffisance du volume d'échantillon déposé (30 µl), de l'insuffisance du volume de la solution employée pour le fractionnement des substances acides et des substances neutres. D'autre part, le solvant phénol-acide formique n'est certainement pas celui qui est susceptible de donner les

meilleures séparations étant donné qu'au cours du développement le pH ne demeure pas uniforme sur toute la surface de la feuille de papier. Il est possible d'amener le pH du chromatogramme à pH 6 en utilisant une solution de Na_2CO_3, mais l'expérience a montré que le tampon phosphate donne de meilleurs résultats. Il faut également veiller à ne pas mettre un excès d'iode (car les spots n'apparaissent pas) ; d'un autre côté il importe cependant d'en mettre suffisamment afin que les spots des substances combinant SO_2 se détachent nettement des artefacts donnés par les impuretés du papier ; quoi qu'il en soit, il importerait de tenter d'améliorer et de mettre au point cette technique de révélation.

Caractérisation supplémentaire de la xylosone par formation de l'osazone correspondante.

A l'état libre nous avons vu que la xylosone est difficile à séparer par chromatographie sur papier car elle donne deux ou plusieurs spots mal séparés, avec une traînée indistincte.

Protocole d'essai. — On reprend le protocole de préparation et de fractionnement des substances neutres libres présentes dans les pics B et C ; à l'extrait dissous dans 0,2 ml d'eau on ajoute 0,5 ml de réactif (0,2 g de phénylhydrazine + 0,3 g d'acétate de sodium dans 5 ml d'eau). A la température ordinaire la réaction de la xylosone et de la phénylhydrazine donne une xylosazone. Cette réaction à la température ordinaire est spécifique de la xylosone et provient de la présence de deux groupements carbonyles voisins ; en effet, les osones des autres sucres nécessitent, pour donner l'osazone correspondante, une température de 100° C.

On attend une heure ; la solution vire au jaune et il se forme un précipité ; on centrifuge, on élimine le surnageant, on dissout le culot dans quelques gouttes d'alcool absolu, et on chromatographie sur couche mince de gel de silice. Le développement est très rapide (30 minutes) ; on obtient un spot net et bien séparé possédant le même Rf (0,55) que celui de la xylosazone témoin.

C. - PREPARATION DES SUBSTANCES TEMOINS

S'il est possible d'obtenir des produits purs pour l'acétaldéhyde, l'acide galacturonique, l'acide pyruvique et l'acide α-cétoglutarique, il n'en est pas de même pour le céto-5 fructose, la xylosone et les acides céto-2 et dicéto-2,5 gluconiques qui ne sont pas encore en vente dans le commerce ; il faut donc préparer ces substances témoins.

— a) Préparation du céto-5 fructose. — La meilleure méthode de préparation est la méthode biologique. On cultive une souche d'**Acetomonas oxydans** pendant 7 jours à 28° C dans 150 ml d'un milieu contenant 10 p. 100 de D-fructose et 0,5 p. 100 d'extrait de levure ; pour faciliter le développement d'**Acetomonas oxydans** il importe de bien aérer le milieu. Quand tout le fructose a été métabolisé par les bactéries (on peut suivre sa disparition par chromatographie) on centrifuge le milieu à 27 000 g pendant 15 minutes ; on fait passer ensuite la solution sur une colonne d'Amberlite IR 120 (forme H^+) puis sur Amberlite IRA 400 (forme acétate).

Le percolat est ensuite concentré à sirop, additionné d'eau et passé sur colonne d'Amberlite IRA 400 forme bisulfite. On lave la colonne à l'eau distillée et on élue le céto-5 fructose au moyen d'une solution à 4 p. 100 d'acétaldéhyde. On collecte des fractions de 25 ml chacune jusqu'à ce que l'éluat contienne seulement le céto-5 fructose (ce que l'on détermine par chromatographie sur papier et révélation par la **p**-anisidine) ; on rassemble les fractions convenables et on les purifie par passages successifs sur Amberlite IR 120 (H^+) et sur Amberlite IRA 400 (acétate).

Le percolat est à nouveau concentré à sirop, puis additionné du mélange méthanol-acide acétique qui entraîne la formation de cristaux de céto-5 fructose qu'on fait recristalliser pour les purifier dans le mélange eau-acide acétique.

— b) Préparation de la xylosone. — On prépare une solution de xylosone en utilisant la méthode mise au point par WHITING et COGGINS. On oxyde l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique par le mélange iode-méthanol et on le précipite sous forme de composé bisulfitique qu'on fait cristalliser dans l'acide acétique à 50 p. 100.

On fait réagir 1,65 g d'acide déhydroascorbique en présence de métabisulfite de sodium dans un tampon phosphate-citrate à pH 7 à 37° C pendant une nuit ; on fait passer ensuite ce milieu sur colonne Dowex 1 forme HSO_3^- et on sépare le pic de xylosone comme dans le cas d'un vin ; le pic de xylosone, élué au moyen d'une solution de $NaHSO_3$ 0,3 M représente environ 66 p. 100 de l'acide déhydroascorbique initial ; il est suivi d'un deuxième pic (élué par une solution de $NaHSO_3$ 0,9 M) encore non identifié. La solution de xylosone-bisulfite de sodium ainsi obtenue est traitée par Zéo-Karb 225 et par évaporation sous vide pour éliminer l'excès de bisulfite de sodium ; la solution ainsi obtenue est utilisée comme solution témoin.

— c) Préparation des acides céto-2 et dicéto-2,5 gluconiques. — On prépare ces acides en utilisant une méthode biologique. On cultive une souche d'**Acetomonas oxydans** à 37° C pendant 10 jours dans un milieu contenant 2 p. 100 de glucose et 0,5 p. 100 d'extrait de levure ; quand tout le glucose a disparu on centrifuge le milieu et on purifie le liquide par passage successif sur Amberlite IR 120 (H^+) et Amberlite IRA 400 (acétate) et on élue successivement les substances fixées par des solutions d'acide acétique de normalités croissantes : N, 2 N, 3 N, 4 N, 5 N et 6 N.

L'acide céto-2 gluconique est élué par les solutions d'acide acétique N et 2 N.

L'acide dicéto-2,5 gluconique est élué par les solutions plus concentrées.

On purifie chacun des éluats par passage sur résine Zéo-Karb 225 (forme H^+) et par évaporation sous vide ; on concentre et on obtient les solutions témoins.

II. ETUDE QUANTITATIVE

1° - ETABLISSEMENT DE LA COURBE EXPERIMENTALE DE COMBINAISON DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX D'UN VIN BLANC.

Pour établir la courbe expérimentale de combinaison de l'anhydride sulfureux, on relie graphiquement les teneurs en SO_2 libre et en SO_2 combiné d'un vin (KIELHOFER et WURDIG, 1960). Nous avons utilisé un vin blanc de 1968 provenant d'une sélection de raisins sains (Ugni blanc).

Dans cinq échantillons de 50 ml chacun, on ajoute des quantités croissantes de métabisulfite de sodium, de façon à obtenir, après établissement complet de l'équilibre, des teneurs en SO_2 libre voisines de 10, 20, 40, 60 et 100 mg par litre. On maintient les fioles jaugées contenant les échantillons pendant 3 jours (ou mieux pendant 5 jours) au bain-marie à 20° C ; après ce délai on détermine les teneurs en SO_2 libre et en SO_2 combiné de chaque échantillon. On porte les valeurs relatives au SO_2 libre en abscisses, celles relatives au SO_2 combiné en ordonnées. On obtient ainsi une courbe d'allure logarithmique qui montre que lorsque le SO_2 libre s'élève, le SO_2 combiné augmente de moins en moins rapidement ce qui est caractéristique d'un équilibre ; cette courbe est spécifique d'un vin donné et constitue la courbe expérimentale de combinaison de l'anhydride sulfureux dans le vin considéré (figure 4).

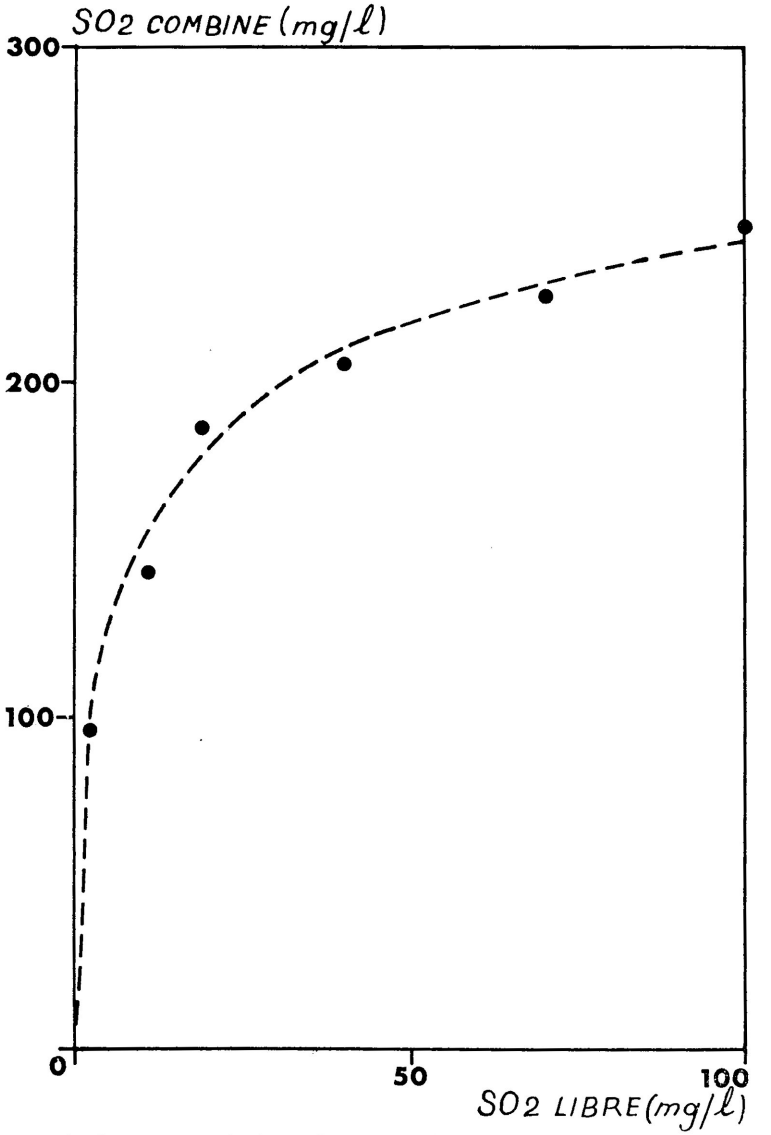


Fig. 4 — Courbe expérimentale de combinaison de l'anhydride sulfureux dans le vin étudié.

2° - METHODES DE DOSAGE.

a — Dosage du SO_2 libre (BURROUGHS et SPARKS, 1964 a)

Principe de la méthode — Après acidification de l'échantillon, on déplace le SO_2 libre, à la température ordinaire, par un courant d'air sous pression réduite ; on recueille le SO_2 dans une solution d'eau oxygénée

et on titre l'acide sulfurique formé par la soude. Une étude quantitative a montré que dans ces conditions le déplacement du SO_2 libre était réalisé totalement après un barbotage d'air de 15 minutes.

Corrections — Malgré le pH très bas (environ 1,5) qui diminue considérablement la tendance à la dissociation du SO_2 combiné, il n'est cependant pas possible d'éviter totalement cet inconvénient, ne serait-ce que parce que l'on déplace l'équilibre entre le SO_2 combiné au cours de la détermination. Le résultat obtenu après dosage représente donc en réalité la somme SO_2 libre + SO_2 dissocié au cours du dosage ; c'est pour cela qu'on effectue un essai à blanc immédiatement après le dosage ; quoique cette correction soit généralement faible, elle peut représenter, particulièrement dans le cas de faibles teneurs en SO_2 libre, jusqu'à 10 p. 100 du SO_2 libre « apparent ».

Appareillage (figure 5) — L'échantillon de vin est placé dans un ballon à fond rond de 250 ml dans lequel plonge un tube permettant l'arrivée d'air ; ce ballon est relié à deux tubes pièges A et B, le second tube n'étant présent qu'à titre de sécurité afin d'être certain de recueillir la totalité du SO_2 libre dans le cas d'échantillon à forte teneur.

Réactifs — Solution d'eau oxygénée — Dans une fiole jaugée de 100 ml on mélange 3,3 ml d'une solution d'H_2O_2 à 10 volumes et 1 ml de réactif de Tashiro (2 volumes de solution alcoolique à 0,1 p. 100 de rouge de méthyle plus 1 volume de solution alcoolique à 0,1 p. 100 de bleu de méthylène) ; on neutralise au moyen de NaOH 0,01 N jusqu'à apparition d'une coloration verte et on complète à 100 ml avec de l'eau distillée.

— Solution de soude 0,01 N

— Solution d'acide **o**-phosphorique à 25 p. 100 (V/V).

Protocole expérimental — On introduit l'échantillon de vin (en général 10 ml) dans le ballon et on ajoute 5 ml d'acide orthophosphorique. Dans chaque tube à absorption on introduit 5 ml de solution oxygénée contenant l'indicateur coloré. On fait le vide et on régularise le barbotage en réglant l'entrée d'air au moyen d'un fil de fer fin qui traverse l'ouverture de la pince de Mohr ; au bout de quelques instants, la couleur de l'indicateur coloré de l'eau oxygénée vire au violet ce qui indique la fixation du SO_2 ; on laisse barboter pendant 15 minutes et on titre l'acide sulfurique formé au moyen de soude 0,01 N. Soit **n** ml versés. Immédiatement après on met en place deux autres nouveaux tubes à absorption et, sur le même

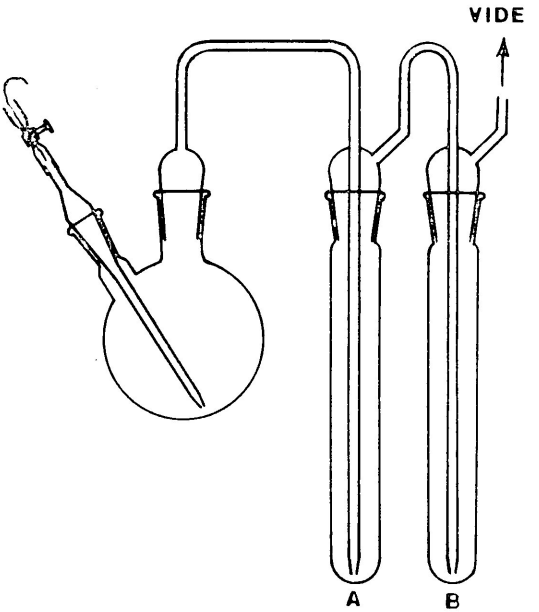


Fig. 5 — Appareillage pour le dosage du SO_2 libre.

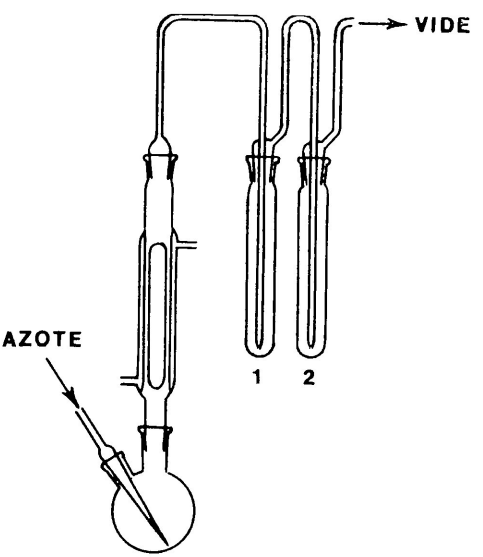


Fig. 6 — Appareillage pour le dosage du SO_2 total.

on recommence la même détermination ; soit **n'** ml de soude 0,01 N versés ; ce résultat correspond à la quantité de SO_2 dissocié pendant le dosage. La teneur réelle de l'échantillon en SO_2 libre est donnée par l'expression :

(**n - n'**) 32 mg de SO_2 libre par litre de vin.

b — Dosage du SO_2 total (BURROUGHS et SPARKS, 1963)

Principe de la méthode — Après acidification de l'échantillon, on procède à une distillation sous reflux et sous courant gazeux d'azote ; le SO_2 libéré est absorbé dans une solution d'eau oxygénée ; on dose l'acide sulfurique formé par une solution de soude de titre convenable.

Appareillage (figure 6) — Il est sensiblement le même que celui utilisé par le dosage du SO_2 libre : un ballon à fond rond de 250 ml comportant un tube pour arrivée de gaz.

— Un réfrigérant placé au-dessus du ballon,

— Deux tubes à absorption.

Protocole expérimental — On introduit 10 ml de vin dans le ballon on acidifie au moyen de 5 ml d'acide orthophosphorique à 25 p. 100 (V/V) et on distille pendant 15 minutes sous reflux et sous courant d'azote, afin d'éviter toute oxydation prématurée ; le SO_2 ainsi libéré est recueilli dans un tube à absorption contenant 5 ml d'une solution à 10 volumes d'H_2O_2.

Résultats — ils sont rassemblés dans le tableau I

TABLEAU I

Etablissement de la courbe expérimentale de combinaison du SO_2 - Dosage du SO_2 combiné.

SO_2 libre	SO_2 total	SO_2 combiné
4,9	103	98,1
12,5	151	138,5
18,3	205	186,7
39,1	244	204,9
69,1	294	224,9
100,7	346	245,3

Les résultats sont exprimés en mg par l.

Pour tracer la courbe expérimentale de combinaison du SO_2 on porte les valeurs du SO_2 libre en abcisse et celles du SO_2 combiné en ordonnée ; on obtient la courbe de la fig. 4.

c — Autres dosages

Dosage de l'acétaldéhyde — la dissociation de l'acide aldéhyde sulfureux n'étant totale qu'à pH alcalin, on distille le vin à pH 9.

Appareillage (figure 7) — L'appareil se compose d'une ampoule à distillation en verre A d'environ 25 cm de long et de 1,5 cm de diamètre ; cette ampoule est placée à l'intérieur d'une deuxième ampoule B ; la communication entre les deux ampoules se fait par l'intérieur du tube t ; la vapeur nécessaire à la distillation provient d'un ballon ; l'ampoule A est reliée à un réfrigérant C.

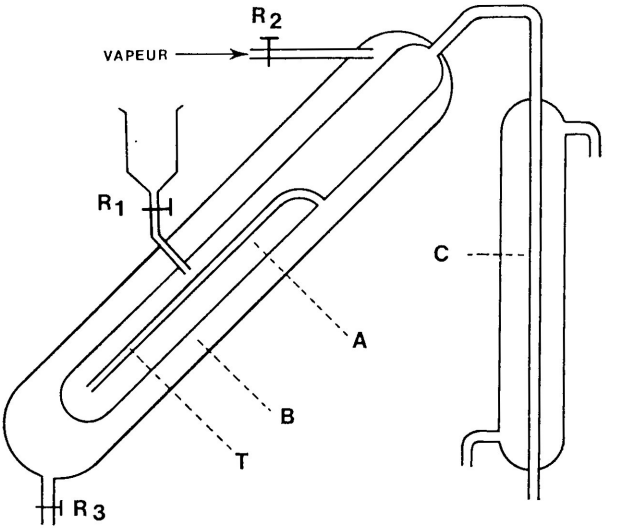


Fig. 7 — Appareillage pour le dosage de l'acétaldéhyde.

Protocole expérimental — Le robinet d'arrivée de la vapeur R_2 étant fermé, 10 ml de vin additionnés de la quantité suffisante de soude N pour les neutraliser en présence de phénolphtaléine et 5 ml de solution tampon à pH 9 sont introduits dans l'ampoule A par l'intermédiaire du robinet R_1 ; on ouvre R_2 ; la vapeur pénètre dans l'ampoule B puis, par l'intermédiaire du

tube t dans l'ampoule A où elle barbotte dans l'échantillon de vin. On recueille le distillat dans un erlen contenant 5 ml de solution tampon à pH 7 et 5 ml de solution de bisulfite à 20 p. 100.

Quand on a recueilli environ 30 ml de distillat, on ferme R_2 et on ouvre le robinet R_3 ; il se produit une aspiration qui par l'intermédiaire du tube t vidange l'ampoule à distillation A ; on rince et l'appareil est prêt pour une autre distillation.

Dosage — On ajoute au distillat 1 ml d'HCl dilué au quart et 2 gouttes d'une solution d'iode concentrée jusqu'au point exact du virage de l'empois on amène le pH à environ 9 par addition de $NaHCO_3$; on titre le SO_2 combiné à l'acétaldéhyde par l'iode 0,01 N.

Dosage de l'acide pyruvique — Le dosage de l'acide pyruvique est réalisé en utilisant la méthode enzymatique mise au point par BLOUIN (1966).

3° - ETUDE DE LA COMBINAISON DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX PAR LES SUBSTANCES IDENTIFIEES.

1° - Détermination de l'anhydride sulfureux combiné à chacune des substances identifiées.

Afin de déterminer la quantité de SO_2 combiné à chacune des substances identifiées, on rassemble dans un même flacon l'ensemble des fractions correspondant à un même pic et on en mesure exactement le volume.

	Volume total de l'ensemble des fractions correspondant à un pic (ml)
Pic B (céto-5 fructose)	45,6
Pic C + D (xylosone + acétaldéhyde + acide céto-2 gluconique)	108,3
Pic E (acide galacturonique)	91,2
Pic F (acide pyruvique + acide dicéto-2,5 gluconique)	96,0
Pic G (acide α-cétoglutarique)	50,8

De façon à déterminer le SO_2 combiné par la (ou les) substance présente dans chaque pic, il faut être certain qu'il ne reste pas de composé présent à l'état libre ; pour cela on amène la concentration en bisulfite de

chacun des éluats à la valeur minimum de 0,4 M en ajoutant la quantité convenable de métabisulfite de sodium ; on laisse réagir 3 heures (ou mieux 6 heures) à la température ordinaire avant de doser le SO_2 combiné. Les solutions contenant les derniers pics (F et G) peuvent être analysées immédiatement ; en effet, la combinaison des substances présentes dans ces éluats est certainement totale étant donné le gradient élevé de la concentration en métabisulfite de la solution éluante. Le dosage du SO_2 combiné est effectué comme précédemment ; les résultats sont rassemblés dans le tableau II.

TABLEAU II

Teneurs en SO_2 combiné dans chaque pic

	SO_2 combiné (m moles par litre)
Pic B (céto-5 fructose)	0,182
Pic C + D (xylosone + acétaldéhyde + acide céto-2 gluconique)	2,180
Pic E (acide galacturonique)	0,638
Pic F (acide pyruvique + acide dicéto-2,5 gluconique)	1,780
Pic G (acide α-cétoglutarique)	0,584

Nous avons déterminé précédemment la teneur en acétaldéhyde (1,65 mmole par litre) ainsi que celle en acide pyruvique (1,50 mmole par litre) ; nous pouvons donc calculer la teneur en SO_2 combiné à chacune des substances présentes dans les pics (tableau III).

TABLEAU III

Teneurs en SO_2 combiné aux substances identifiées présentes dans les pics

	SO_2 combiné (mmole par litre)
céto-5 fructose	0,182
xylosone	0,530
acétaldéhyde	1,650
acide galacturonique	0,638
acide pyruvique	1,50
acide dicéto-2,5 gluconique	0,280
acide α-cétoglutarique	0,584

(Nous avons négligé le SO_2 combiné à l'acide céto-2 gluconique présent seulement à l'état de traces).

2° - Etablissement de la courbe théorique de combinaison du SO_2.

L'établissement de la courbe théorique de combinaison du SO_2 et sa comparaison avec la courbe expérimentale permet de vérifier l'exactitude du bilan établi dans le tableau III.

L'équation donnant la valeur de la constante de dissociation K d'une substance, en présence d'un excès de SO_2 s'écrit de la façon suivante :

$$K = \frac{(l) \times (A - C)}{(C)} \qquad (1)$$

où (l) est la concentration molaire en SO_2 libre
(A) est la concentration molaire en composé carbonylé total (libre + combiné)
(C) est la concentration molaire en SO_2 combiné

Cette équation peut s'écrire :

$$(C) = (A) \times \frac{(l)}{K + (l)} \qquad (2)$$

Si l'on connait K et (A) l'équation (2) permet de calculer la quantité de SO_2 combiné (C) pour n'importe quelle teneur en SO_2 libre (l) et d'établir ainsi la courbe théorique de combinaison de l'anhydride sulfureux dans le vin.

Nous connaissons, pour chaque substance, la concentration molaire (A). En ce qui concerne la valeur du rapport $(l)/K + (l)$ si l'on a déterminé au préalable les valeurs de K au pH considéré, on peut calculer la valeur du rapport pour des valeurs bien précises de (l) ; c'est ce à quoi se sont attachés BURROUGHS et SPARKS. D'après les valeurs établies par ces auteurs, nous avons calculé celles rassemblées dans le tableau V.

Les résultats obtenus (SO_2 combiné pour les valeurs correspondantes de SO_2 libre) permettent d'obtenir la courbe de la figure 8. Les résultats montrent que la courbe théorique de combinaison de l'anhydride sulfureux est très voisine de la courbe expérimentale obtenue au début de ce travail. Cependant elle est située au-dessus de la courbe expérimentale ; ce fait est paradoxal ; il semblerait en effet logique de penser trouver la courbe théorique au-dessous de la courbe expérimentale ; en effet le bilan du SO_2 combiné établi dans le tableau V ne tient compte que des principales

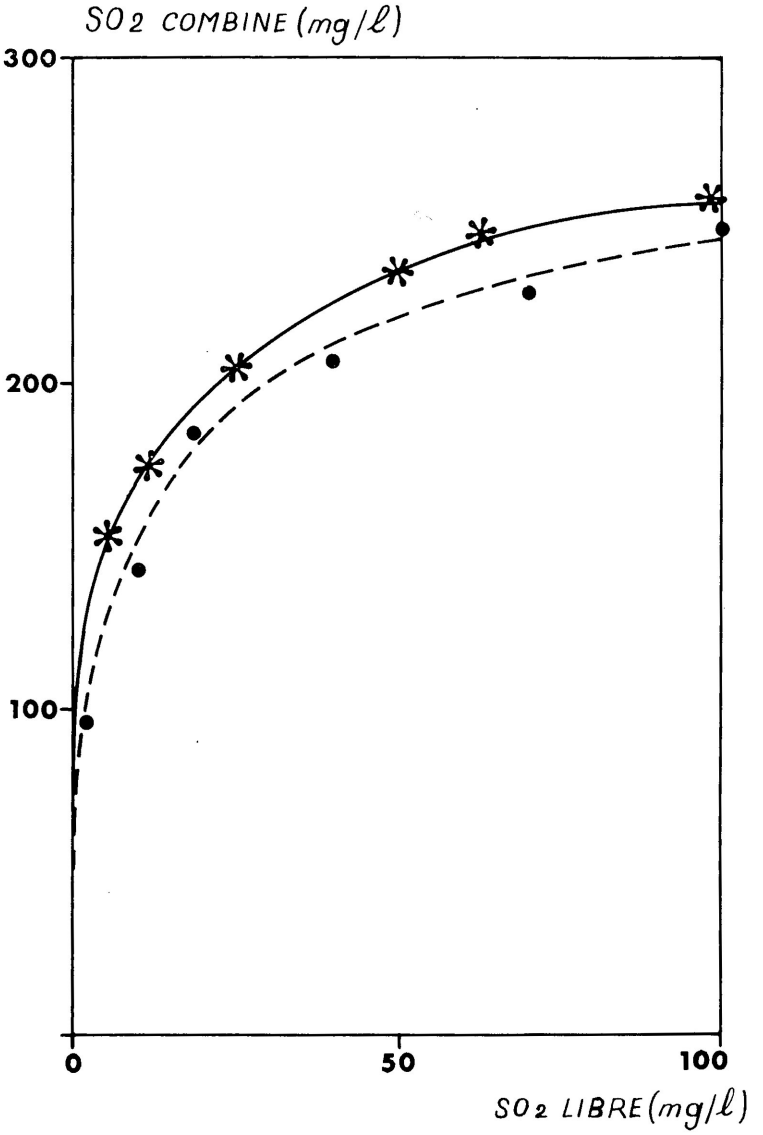


Fig. 8 — Comparaison de la courbe expérimentale de combinaison du SO_2 et de la courbe théorique.
o ——— o courbe expérimentale.
* ——— * courbe théorique

substances susceptibles de combiner l'anhydride sulfureux ; nous n'avons pas compté le SO_2 combiné aux sucres (en quantité faible il est vrai) ni celui combiné aux polyphénols (également en faible quantité), ni celui combiné à l'acide céto-2 gluconique présent dans les pics C + D (xylosone + acétaldéhyde). Cependant, malgré les erreurs par défaut de notre calcul dues aux approximations évoquées, la teneur théorique en SO_2

TABLEAU V

Etablissement de la courbe théorique de combinaison du SO_2
Calcul de la teneur en SO_2 combiné pour des valeurs données du SO_2 libre

Substance	K à pH = 3,8	Concentration (m mole)	SO_2 combiné (mg par l) pour les valeurs ci-dessous indiquées du SO_2 libre (mg par l)					
			6,4	12,8	25,6	51,2	64	96
Céto-5 fructose	$3,3 \times 10^{-4}$	0,182	2,7	4,4	6,3	8,2	8,7	9,5
Xylosone	$1,4 \times 10^{-3}$	0,530	2,3	4,2	7,5	12,3	14,1	14,2
Acétaldéhyde	$1,5 \times 10^{-6}$	1,65	104,0	104,8	105,1	105,3	105,4	105,4
Acide galacturonique	2×10^{-2}	0,638	0,20	0,40	0,80	1,50	1,90	2,8
Acide pyruvique	2×10^{-4}	1,50	31,9	48,0	64,0	76,8	79,9	84,6
Acide dicéto-2,5 gluconique	$4,3 \times 10^{-4}$	0,28	3,50	5,60	8,50	11,6	12,5	13,9
Acide α-cétoglutarique....	$6,6 \times 10^{-4}$	0,584	4,9	8,7	14,2	20,6	22,6	26,1
SO_2 combiné			155,5	176,1	206,4	263,3	244,1	255,5

combiné pour une même valeur de SO_2 libre est supérieure à la valeur obtenue expérimentalement. Cela peut signifier que le temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre, lors de l'établissement de la courbe expérimentale n'a pas été suffisant pour permettre à la totalité des substances présentes de se combiner à l'anhydride sulfureux.

Quoi qu'il en soit, le voisinage des deux courbes montre que le fractionnement des substances présentes dans l'échantillon étudié de vin et combinant l'anhydride sulfureux est complet ; ce résultat est également en accord avec le chromatogramme obtenu (figure 6) qui ne permet pas de mettre en évidence d'autres substances après le pic correspondant à l'acide α-cétoglutarique.

CONCLUSION

Par fractionnement des substances d'un vin sur colonne de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 forme bisulfite) nous avons pu identifier 8 substances qui interviennent dans la combinaison de l'anhydride sulfureux : le céto-5 fructose, la xylosone, l'acétaldéhyde, les acides céto-2 et dicéto-2,5 gluconiques, l'acide pyruvique, l'acide galacturonique et l'acide α-cétoglutarique.

Nous avons vu, tant du point de vue qualitatif que quantitatif, que ces substances semblent représenter la totalité des composés susceptibles de combiner le SO_2 ; il est possible cependant, qu'à côté de ces corps présents en quantités appréciables et parfois même importantes, d'autres substances jouent également un rôle dans cette combinaison. Cependant, dans le cas de l'échantillon analysé, celles-ci, si elles sont présentes, le sont en trop faible quantité pour être détectées et identifiées ; cela n'est peut-être pas toujours le cas ; en comparant les résultats obtenus dans le cas de vin issus de raisins sains et ceux de vins provenant de vendanges pourries qui, précisément, combinent fortement le SO_2, il serait intéressant de déterminer si les différences, dans les deux cas, sont seulement quantitatives (les substances restant les mêmes) ou bien si d'autres corps sont également présents. C'est ce à quoi, en utilisant cette technique, intéressante et prometteuse, nous nous emploierons à déterminer sur les vins et en particulier sur ceux de Bordeaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLOUIN J., 1966, **Contribution à l'étude de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les moûts et dans les vins.** Thèse Docteur-Ingénieur Bordeaux.

BLACKWOOD A.C., 1969, Etude des bactéries acétiques isolées de raisins et de vins - II - Production de composés cétoniques, **Conn. Vigne Vin, 3,** 3, 243-250.

BURROUGHS L.F., 1964, Quantitative aspects of free and bound sulphur dioxide in cider, **4th International Symposium on Food Microbiology,** Göteborg, Suède.

BURROUGHS L.F., SPARKS A.H., 1963, The determination of total sulphur dioxide content of ciders, **The Analyst, 88,** 1045, 304-309.

BURROUGHS L.F. et SPARKS A.H., 1964 a, The determination of free sulphur dioxide content of ciders, **The Analyst, 89,** 1054, 55-60.

BURROUGHS L.F. et SPARKS A.H., 1964 b, The identification of sulphur dioxide binding compounds in apple juice and ciders, **J. Sci. Fd. Agric., 3,** 176-185.

KIELHÖFER E. et WÜRDIG G., 1960, Die an unbekannte Weinbestandteile gebundene schweflige Saüre (Rest-SO_2) und ihre Bedeutung für den Wein (1), **Weinberg und Keller, 7,** 313.