IDENTIFICATION DES DERIVES TERPENIQUES DANS LES RAISINS DE CERTAINES VARIETES DE **VITIS VINIFERA**

I - TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

A. TERRIER et J.N. BOIDRON
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II

A. - TRAVAUX ANTERIEURS

AUSTERWEIL (1946) a émis le premier l'hypothèse que l'arôme de muscat serait dû au linalol ou à ses dérivés.

Dans un travail fondamental resté classique, CORDONNIER (1956) montre que les extraits par l'éther de pétrole d'un vin de muscat présentent des taches dont les Rf et les réactions colorées avec l'acide sulfurique concentré laissent supposer la présence de limonène, de linalol, de géraniol et d'α-terpinéol dans la composition de l'arôme de ce type de vin. BAYONOVE et CORDONNIER (1970 a et b) confirment la présence du linalol dans différents Muscats : Alexandrie, Hambourg, Frontignan, Fleur d'Oranger, Ottonel, Reine des Vignes ; ils montrent également l'absence de ce corps, tout au moins en quantité notable, dans le Cabernet-Sauvignon, le Merlot, le Syrah, le Piquepoul et le Chasselas.

Dans leurs premiers travaux sur le Muscat d'Alexandrie, WEBB et KEPNER (1957, 1961) ne mettent pas en évidence de fraction terpénique ; ce résultat est, selon toute vraisemblance provoqué par la dégradation des composés terpéniques lors de l'extraction par chauffage. D'ailleurs, en 1966, WEBB et **al.** (1966) identifient le linalol, l'α-terpinéol et les oxydes pyranniques et furanniques du linalol dans huit variétés muscat : Aleatico, Muscat précoce, Malvasia bianca, Alexandrie, Hambourg, Orange Muscat, P 20-59 et Q 26-39. VAN WICK, KEPNER et WEBB (1967) relèvent de faibls quantités de linalol dans un extrait par le chlorure de méthylène de vin « White Riesling ».

Ces mêmes substances terpéniques accompagnées du limonène, du myrcène, du citronellol, du nérol et du géraniol ont été signalées par STEVENS et **al.** (1966) dans l'essence de Muscat d'Alexandrie, par chromatographie gazeuse sur colonne capillaire de GE-SF 96, en même temps qu'une soixantaine d'autres composés. Dans une publication ultérieure (1967), ces mêmes auteurs notent la présence, en très faible quantité, de limonène, de linalol, d'α-terpinéol, de citronellol, de nérol et de géraniol dans les raisins de Grenache ; ils signalent exclusivement le limonène dans ce même cépage ainsi que le **p**-menthène-1 ol-8 dans une autre publication (1969).

USSEGLIO-TOMASSET (1966 a), à partir d'extraits par le pentane de différents cépages : Muscat de Hambourg, Muscat d'Alexandrie, Muscat Blanc du Piémont, Muscat d'Adda, Muscat de Syracuse, Pirovano-1 (Hambourg x Chasselas rosé), Dalmasso 11/6 (Hambourg x Dattier de Beyrouth) met en évidence, par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie sur couche mince une substance responsable de l'arôme caractéristique, absente des cépages non muscat (Barbera, Nebbiolo) mais présente dans le Riesling du Rhin. Dans une seconde publication, cet auteur, associé à ASTEGIANO et MATTA (1966 b) l'identifie au linalol.

WENZEL et de VRIES (1968) tout en identifiant le linalol dans le Muscatel Rouge et le « White Hannepot » (Muscat d'Alexandrie) n'ont pas pu établir clairement un rapport entre la teneur en linalol et l'arôme typique du muscat, rejoignant en cela les conclusions de WEBB et **al.** (1966).

PRILLINGER et MADNER (1969) mettent en évidence, à partir d'extraits de moût et de vin par le mélange éther-pentane (1-2, v/v), le linalol dans les variétés Grüner Veltliner, Rheinriesling, Müller-Thurgau ainsi qu'un « composant muscat » non identifié présent dans les moûts et vins de Müller-Thurgau et Rheinriesling, décelable dans le moût de Grüner Veltliner (forme musquée du Chardonnay blanc d'après GALET, 1957), mais absent de Weissburgunder (Melon). Dans un autre travail (1970) ces auteurs identifient le linalol et l'α-terpinéol dans des variétés muscat (Oliver Irsaj, Muscat Ottonel) et signalent la présence de deux substances qui seraient caractéristiques de l'arôme muscat, l'une d'entre elles est le « composant muscat » signalé en 1969. Toutes ces substances sont présentes en plus faible quantité dans le Rheinriesling et le Grüner Veltliner.

RODOPULO et **al.** (1970) mettent en évidence dans les vins de muscat le linalol, le géraniol et le farnésol par chromatographie sur couche mince. Précédemment PISSARNITSKI (1966) avait identifié par

la même méthode le farnésol, le linalol et la β-ionone dans les extraits par le pentane de Cabernet et de Riesling.

HARDY (1970) identifie le linalol et l'α-terpinéol par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse dans les extraits de Muscat d'Alexandrie par le Freon II (trichlorofluorométhane). Le géraniol est identifié seulement par comparaison des temps de rétention. Au cours de la conservation de l'extrait (8 semaines à — 10° C et 4 jours à température ambiante), l'auteur constate la disparition du pic correspondant au géraniol et l'apparition de carbures terpéniques, en particulier le limonène et le myrcène ; il émet l'hypothèse que ces carbures ne sont pas présents dans le raisin et sont formés, à partir du géraniol, durant la conservation de l'extrait.

En somme, le linalol peut être considéré comme une substance primordiale de l'arôme du muscat ; néanmoins, il est probable que d'autres substances participent à cet arôme (WEBB et **al.**, 1966 ; WENZEL et de VRIES, 1968 ; BAYONOVE et CORDONNIER, 1970 a et b). En outre, le linalol ne semble pas être caractéristique des seules variétés muscat car il a été signalé dans d'autres cépages (Riesling, Grüner Veltliner, Müller-Thurgau, Cabernet, Grenache).

En ce qui concerne les autres dérivés terpéniques, les résultats signalés dans la littérature sont confus et quelquefois contradictoires.

La présence d'α-terpinéol semble bien acquise ; elle avait été signalée par HENNIG et VILLEFORTH (1943) et par CORDONNIER (1956) puis confirmée par STEVENS et **al.** (1966), WEBB et **al.** (1966), USSEGLIO-TOMASSET (1969), PRILLINGER et MADNER (1970), HARDY (1970). Par contre, la présence de géraniol signalé par CORDONNIER (1956), STEVENS et **al.** (1966), HARDY (1970), RODOPULO et **al.** (1970), celle du nérol et du citronellol (STEVENS et **al.**, 1966) celle du farsénol (PISSARNITSKI, 1966 ; RODOPULO et **al.**, 1970), du myrcène (STEVENS et **al.**, 1966), du limonène (CORDONNIER, 1956 ; STEVENS et **al.**, 1966) ne sont pas admises par tous les auteurs.

B. - PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. — Traitement du raisin.

Les analyses étant échelonnées sur plusieurs mois, il est nécessaire de conserver les échantillons sans possibilité d'altération. Un à trois kilo-

grammes de raisin sont éraflés grain par grain. Seuls les grains parfaitement sains sont broyés en présence de 500 mg par kilogramme de raisin, de fluorure de sodium employé comme antiseptique et de 500 mg d'acide ascorbique utilisé pour ses propriétés antioxydantes. Ce broyat peut être conservé au froid (0° C) pendant les quelques semaines de la période de maturation sans oxydation et sans début de fermentation. Néanmoins pour une conservation définitive, un traitement supplémentaire est nécessaire. il a été effectué simultanément sur tous les échantillons prélevés, dans le courant du mois de novembre. Pour ce traitement définitif, le mélange grossier précédemment obtenu est broyé finement durant 4 minutes à 400 tours par minute à une températre de 0° C. Ce nouveau broyat est ensuite centrifugé à 9000 tours par minute durant 3 minutes, également à basse température (0° C). Le jus récupéré est conservé à 4° C.

Au cours des années précédentes nous avons constaté que ce seul traitement n'est pas suffisant, car il se développe en quelques mois sur les jus ainsi obtenus une grande quantité de moisissures. Aussi nous avons envisagé l'utilisation de la filtration stérile, technique qui donne d'excellents résultats. L'appareil utilisé est un filtre à membrane, en acier inoxydable (Sartorius type 162-28). Une première filtration non stérilisante est effectuée sur plaque de cellulose amiante (type K 10). Le jus débarrassé des particules les plus grossières est filtré une seconde fois sur des membranes filtrantes constituée par de dérivés de cellulose et d'autres substances polymères à pores suffisamment fins pour éliminer tous les microorganismes (diamètre des pores : 1 et 0,27 microns).

Le filtre et la membrane sont stérilisés à l'autoclave à 120° C durant 20 minutes. La filtration a lieu en atmosphère aseptisée par la présence de flammes. Nous utilisons un préfiltre en fibre de verre et deux membranes filtrantes superposées. La quantité de jus obtenue en une seule filtration varie de 1 à 15 litres en fonction de sa composition. Le filtrat est recueilli dans un récipient stérile et conservé au froid (4° C) jusqu'à l'analyse. Ce type de préparation est satisfaisant car des échantillons conservés depuis deux ans ne présentent aucune altération bactérienne, oxydative ou organoleptique. Des analyses chromatographiques effectuées au cours de la conservation ont confirmé la stabilité de la composition de ces milieux.

2. — **Extraction et concentration des substances étudiées par solvant organique.**

La faible teneur des jus et des vins en substances aromatiques et les artefacts dûs à la pyrolyse des sucres ne permettent pas une analyse

chromatographique par injection directe ; la mise en œuvre d'une méthode d'extraction et de concentration est nécessaire. Les techniques ne faisant pas appel à des traitements thermiques ou à l'apport de substances détectables en chromatographie en phase gazeuse (solvants) sont a priori les plus intéressantes. BERTRAND et **al.** (1967) utilisent l'entraînement par un gaz inerte (azote) et le piégeage par le froid pour concentrer les substances les plus volatiles du vin. BAYONOVE et CORDONNIER (1970 a et b) emploient également l'entraînement par l'azote durant 24 heures pour extraire le linalol des jus de muscat. Cette technique est insuffisante, particulièrement dans le cas des substances présentant un point d'ébullition élevé, tels les alcools terpéniques.

La distillation fut employée dès 1920 par POWER et CHESNUT pour recueillir les produits odorants des pommes. MILLEVILLE et ESKEW (1944, 1946) ont mis au point un système de flash évaporation suivi d'une colonne à rectifier. La distillation sous vide apporte des améliorations au procédé en évitant les altérations dûes à une température trop élevée, (BOMBEN et **al.**, 1967). Nous n'avons pas retenu cette technique, surtout valable pour des quantités importantes, car elle présente des inconvénients : transformations au cours de l'extraction, pertes en substances aromatiques

Nous avons donc fait appel à l'extraction par solvants. Dès 1936, PEYNAUD utilisa l'éther de pétrole pour extraire les esters du vin ; par la suite cette méthode a connu un grand développement.

a/ - Choix d'un solvant.

Dans le cas du vin, BOIDRON (1966) a étudié systématiquement les avantages respectifs de nombreux solvants : éther éthylique - acétone (1-1, v/v), éther éthylique, hexane - acétone (2-1, v/v), éther de pétrole, chloroforme, chorure de méthylène, éther-pentane (2-1, v/v), pentane. Il propose une première extraction par le pentane durant 200 heures suivie d'une deuxième extraction par le chlorure de méthylène (30 heures). Il indique que le mélange azéotrope éther - pentane (2-1, v/v) entraîne une trop grande extraction d'éthanol et donc une dilution des composés aromatiques ; néanmoins ce solvant a été très employé. MECKE et de VRIES l'ont proposé en 1959, BARAUD (1960), BARAUD et MAURICE (1963), FLANZY et JOURET (1963), MAARSE et **al.** (1966), WENZEL et de VRIES (1968) ont repris ce mélange azéotrope. Pour leur part, PRILLINGER et **al.** (1967, 1968 a et b, 1969, 1970) ont employé 2 volumes de pentane pour un volume d'éther.

Le pentane a été également largement utilisés : HENNIG et VILLFORTH (1942), MECKE et de VRIES (1959), DRAWERT (1960). WEBB et **al.** (1963, 1964, 1966), USSEGLIO-TOMASSET (1966 a et b, 1969).

BOIDRON (1966) considère que le chlorure de méthylène est un très bon solvant pour les corps moins volatils que le **n**-propanol. D'autres auteurs ont employé ce solvant, particulièrement DRAWERT (1960), WOLFORD et **al.** (1962), VAN WICK et **al.** (1967), MOSHONAS et SHAW (1971). DRAWERT et RAPP (1966) ont utilisé le mélange pentane-chlorure de méthylène (1-1, v/v) alors que BERTRAND (1968) a proposé 7 volumes de pentane et 3 volumes de chlorure de méthylène.

Parmi les autres solvants nous pouvons citer l'isopentane (SUOMALAINEN et NYKANEN, 1964 ; STEVENS et **al.**, 1966, 1967 a et b, FLATH et **al.**, 1967), le chlorure d'éthyle (Mc GREGOR et **al.**, 1964; DRAWERT et RAPP, 1966), le chloroforme (JAKOB et BACHMANN, 1964). Plus récemment des composés à point d'ébullition très bas ont été suggérés, en particulier le trichlorofluorométhane (Freon 11), (HARDY, 1969 ; STEVENS et **al.**, 1969).

Nous avons comparé parmi les solvants précédents, ceux susceptibles d'être adaptés à nos problèmes, en particulier le chlorure de méthylène, le pentane, l'éther-pentane (2-1, v/v), le chloroforme et l'éther de pétrole. Seuls les trois premiers ont donné satisfaction et ont été retenus, en effet l'éther de pétrole contient un grand nombre d'impuretés et l'extraction par le choroforme est moins complète pour les substances considérées.

b/ - Purification des solvants.

Les solvants livrés par le commerce ne peuvent pas être utilisés directement ; en effet nous avons constaté que le résidu de leur distillation est très riche en impuretés non identifées, mais dont les temps de rétention en chromatographie en phase gazeuse sont plus élevés qu'on ne pouvait le supposer et correspondent à des pics d'importance appréciable dans les conditions de la chromatographie. Nous pouvions penser qu'une rectification poussée permettrait d'éliminer ces impuretés. Nous avons utilisé pour cette opération une colonne rectificatrice de 50 cm de longueur, remplie de tissu d'acier inoxydable, type « Multiknit », préalablement dégraissé, surmontée d'une colonne de Vigreux de longueur sensiblement égale. Le reflux est réglé par un robinet à pointeau en téflon.

L'appareillage est maintenu très propre et dégraissé, les rodages étant exempts de graisse, les produits conservés à l'abri de la lumière. Ces précautions ont seulement diminué les phénomènes observés.

Dans le cas du pentane qui permet une bonne extraction des jus de raisin, nous avons comparé plusieurs qualités commerciales et vérifié leur pureté après chaque distillation, en injectant 1 µ l du résidu de la distillation (concentré 6000 fois) dans le chromatographe. Une qualité de pentane (fournie pour 95 pour cent de pentane et 4 pour cent d'isopentane) distillée en une seule fois a présenté un pureté supérieure à celle obtenue après cinq distillations de plusieurs autres qualités commerciales.

Dans le cas du chlorure de méthylène, la pureté étant supérieure, même après une seule distillation ; c'est donc ce deuxième solvant que nous avons employé de manière habituelle, les extraits par le pentane étant uniquement utilisés pour confirmer certains résultats.

Nous pensons que cet aspect du problème, pourtant très important, n'a pas été suffisamment approfondi par plusieurs auteurs et que certaines substances, identifiées ou non, sont ds impuretés du solvant (RIBÉREAU-GAYON, 1971).

c/ - Mode opératoire.

WEURMAN (1969) a montré que la quantité de solvant nécessaire et le temps d'extraction sont d'autant plus importants que les substances sont plus diluées. Certains auteurs (WOLFORD et **al.**, 1962 ; STEVENS et **al.**, 1969) conseillent donc d'effectuer une première concentration par distillation sous vide. Cependant, les faibles quantités dont nous disposions et les risques d'altération par chauffage nous ont conduits à extraire directement à partir des solutions initiales.

Avec trois solvants différents, BOIDRON (1966) a montré la supériorité de l'extraction en continu par rapport à l'extraction en ampoules à décanter. Cependant, la durée de l'agitation considérée étant relativement faible, nous avons constaté qu'on augmentait l'efficacité de l'extraction en remplaçant l'agitation manuelle en ampoule à décanter (5 minutes) par une agitation mécanique de durée plus importante (180 minutes). Cette technique nous a paru plus intéressante que l'extraction en continu qui exige en outre un appareillage important et le traitement de jus très aromatiques, tels les jus de muscat, devrait être suivi d'un lavage long et délicat de l'appareil.

Nous avons utilisé des flacons en verre inactinique, afin d'éviter les risques de réactions photochimiques. Ces flacons sont fermés par un bouchon rodé sans graisse ou un bouchage à vis avec joint de téflon.

TABLEAU I

Caractéristiques des colonnes utilisées en chromatographie en phase gazeuse.

Type de colonne	Phase stationnaire	Température maxi d'utilisation	Polarité	Pourcentage de phase stationnaire	Nature du support	Granulométrie (mesh)	Longueur des colonnes
Carb. 1540	Polyéthylène glycol 1540	150 °C	++++	10 %	chromosorb W « acid washed »	60-80	4 m
Carb. 20 M	Polyéthylène glycol 20 M	200 °C	+++	10 %	chromosorb W HMDS	60-80	4 m et 6 m
Carb. 20 M TPA	Polyéthylène glycol 20 M + acide téréphtalique	230 °C	++++	10 %	chromosorb W « acid washed »	60-80	4 m
QF 1	Silicone DCQF 1	250 °C	++	10 %	chromosorb W « acid washed »	80-100	2 m et 4 m
SF 96	Silicone GESF 96	250 °C	+	10 %	chromosorb W « acid washed »	80-100	2 m et 6 m
FFAP	Free Fatty Acid Phase	220 °C	++++	10 %	chromosorb W HMDS	80-100	4 m

650 ml de jus de raisin sont agités avec 350 ml de solvant durant 180 minutes à 40 tours par minute. Les deux phases sont ensuite séparées en ampoules à décanter, l'émulsion formée au cours de l'agitation étant cassée au préalable par centrifugation (10 minutes à 3000 tours par minute). Une seconde extraction du jus, de même durée, est ensuite faite avec 300 ml de solvant. Les phases organiques sont rassemblées et séchées durant 24 heures sur sulfate de sodium anhydre. Le solvant est distillé au bain marie dans un ballon prolongé à sa base par un tube cylindro-conique dans lequel l'extrait est concentré. Le résidu de la distillation (0,2 ml environ) qui contient les substances à étudier très concentrées, est conservé à — 20° C jusqu'à l'analyse.

C. - METHODES ANALYTIQUES

1. — Techniques de chromatographie en phase gazeuse.

a/ - Appareils utilisés.

Nous disposons de deux appareils à ionisation de flamme avec programmation de température. La présence de deux détecteurs permet de travailler « en opposition ». Ces deux appareils sont les suivants :

HEWLETT PACKARD type 5750 (utilisable en chromatographie micro-préparative).

INTERSMAT type IGC 15.

b/ - choix des colonnes.

Dans le tableau I nous indiquons les principales caractéristiques des colonnes utilisées. Toutes les colonnes analytiques sont en acier inoxydable, de diamètre 1/8 de pouce. Nous avons également préparé une colonne préparative de 1/4 de pouce de diamètre et 4 mètres de longueur. Cette colonne est remplie de FFAP (Free Fatty Acid Phase) à 20 pour cent enrobant du Chromosorb W « Hexaméthyl disilazane » (HMDS) de granulométrie 60-80 mesh.

c/ - Mode opératoire.

Nous utilisons comme gaz vecteur l'azote de qualité « R ». Pour les colonnes classiques (1/8 de pouce de diamètre) le débit est compris entre 20 et 25 ml par minute ;pour les colonnes préparatives (1/4 de pouce de diamètre), il est de l'ordre de 80 ml par minute.

Pratiquement, sur colonnes polaires (Carb. 20M, Carb. 20M TPA, FFAP) nous avons une bonne séparation avec une programmation linéaire de 2° C par minute de 65° C à 200° C et un débit de gaz vecteur de 20 ml par minute.

2. — **Techniques de chromatographie sur couche mince.**

a/ - Préparation des plaques.

Les plaques utilisées sont des plaques de verre (20 cm x 20 cm), dont la surface est parfaitement nettoyée et dégraissée. Les plaques sont préparées selon la méthode décrite par STAHL (1962) et RANDERATH (1964) : 40 grammes de gel de silice G « Merck » sont mélangés avec 80 ml d'eau. Le mélange est rapidement versé sur un étaleur semi-automatique « B.T.L. ». L'épaisseur de la couche de silice est déterminée et doit être parfaitement homogène : 0,2 mm pour les plaques analytiques et 0,6 mm pour les plaques préparatives. Les plaques sont ensuite séchées à l'air une dizaine de minutes, puis activées durant 30 minutes à l'étuve à 110° C. La conservation se fait à l'abri de l'humidité.

b/ - Solvants.

Une étude systématique faite sur sept substances témoins (linalol, α-terpinéol, nérol, géraniol, citronellol, farsénol, acétate de linalyle) et sur des extraits de jus de raisin nous a permis de comparer plusieurs solvants (tableau II). Les solvants n° 16 (acétate d'éthyle 20-acide acétique 1-cyclohexane-79) et n° 17 (benzène 40-méthanol-2) nous ont donné les meilleures séparations.

c/ - Révélateurs.

Après de nombreux essais nous avons retenu comme révélateurs :

— **Vanilline sulfurique** : 1 g de vanilline dans 20 ml d'acide sulfurique pur (LEWIS et **al.**, 1966).

— **Anisaldéhyde** : méthanol 96 - anisaldéhyde 2 - acide sulfurique pur 2 (ter HEIDE, 1968).

Après pulvérisation, les plaques sont chauffées une dizaine de minutes à l'étuve à 90° C ; les spots sont alors visibles, mais les colorations obtenues ne sont pas stables dans le temps. Il est recommandé de procéder à une observation 30 minutes, puis 12 heures après pulvérisation.

TABLEAU II

Solvants utilisés en chromatographie sur couche mince

Numéro du solvant	Composition	Références
1	Benzène	ATTAWAY & **al.**, 1965
2	Benzène 95-Acétate d'éthyle 5	
3	Benzène 90-Acétate d'éthyle 10	
4	Benzène 85-Acétate d'éthyle 15	MILLER & **al.**, 1953
5	Benzène 80-Acétate d'éthyle 20	
6	Hexane	KIRCHNER & **al.**, 1951
7	Hexane 95-Acétate d'éthyle 5	
8	Hexane 90-Acétate d'éthyle 10	
9	Hexane 85-Acétate d'éthyle 15	GEYER & **al.**, 1965
10	Hexane 80-Acétate d'éthyle 20	POMONIS & **al.**, 1969
11	Acétate d'éthyle	
12	Benzène 1-Chloroforme 1	
13	Chloroforme	KIRCHNER & **al.**, 1951
14	Ether de pétrole 85-Acétate d'éthyle 15	CORDONNIER, 1956
15	Chloroforme 30-Acide acétique 1 Tétrachlorure de carbone 69	Mc LEOD & **al.**, 1966
16	Acétate d'éthyle 20-Acide acétique 1-Cyclohexane 79	Mc LEOD & **al.**, 1966
17	Benzène 40-Méthanol 2	LEWIS & **al.**, 1966
18	Chloroforme 90-Acétate d'éthyle 10	MILLER & **al.**, 1953
19	Chloroforme 95-Acétate d'éthyle 5	MILLER & **al.**, 1953
20	Chloroforme 85-Carbonate d'éthyle 15	MILLER & **al.**, 1953

d/ - Mode opératoire.

Les spots de départ sont placés à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque à l'aide de micropipettes ; 5 à 10 µl de l'extrait de raisin sont nécessaires pour obtenir des taches visibles. Pour les substances témoins, il suffit de 1 µl de la substance pure diluée cent fois.

Le développement s'effectue dans des cuves classiques ou dans des cuves de type « sandwich » dans lesquelles la saturation est meilleure, mais les effets de bord sont plus importants. Nous laissons migrer le solvant jusqu'à 2 cm du bord supérieur de la plaque. Celle-ci est ensuite séchée quelques instants à l'air, révélée et mise à l'étuve.

Après avoir constaté que les conditions de l'expérience étaient difficilement reproductibles, nous n'avons pas tenu compte des Rf des substances, mais plutôt du rapport :

$$\frac{\text{Distance parcourue par la substance} \times 100}{\text{Distance parcourue par le linalol (témoin)}}$$

3. — **Mise en œuvre des techniques chromatographiques et spectrométriques.**

a/ - Couplage chromatographie sur couche mince - chromatographie en phase gazeuse.

L'application sur plaque préparative se fait sous forme de traits à l'aide d'un « chromatocharger » de marque Camag, type 27500. Les dépôts sont de 200 µl sur une longueur de 18 cm.

Après développement, seuls les bords de la plaque sont révélés, la durée du passage à l'étuve doit être réduite au maximum afin d'éviter de trop grandes pertes de substance. Nous déterminons des bandes parallèles au front du solvant, correspondant à une substance révélée. Le gel de silice de chaque bande est récupéré dans un tube de verre effilé à sa partie inférieure, puis élué par 0,2 ml d'acétone environ. L'éluat récupéré est injecté sur colonne analytique en chromatographie gazeuse.

La correspondance entre une bande et un pic ne peut pas être établie de façon définitive, car certaines substances non révélées sur couche mince, sont détectées en chromatographie en phase gazeuse ; d'autre part, plusieurs substances ayant les mêmes Rf peuvent avoir des temps de rétention différents.

b/ - Couplage chromatographique en phase gazeuse - chromatographie sur couche mince.

Une colonne préparative à 20 p. 100 de FFAP permet une bonne séparation de la fraction terpénique dans les conditions suivantes : débit d'azote de 80 ml par minute ; isotherme de température de 20 minutes

à 130° C, puis montée en température à raison de 1° C par minute jusqu'à 180° C. A l'extrémité de la colonne, il existe une dérivation qui conduit à une sortie chauffée à 300° C afin d'éviter les risques de condensation dans les conduites. En bout de la sortie chauffée nous plaçons une aiguille de seringue hypodermique dont l'extrémité vient s'appliquer sur une plaque analytique. Durant le passage de la substance, contrôlable par la lecture de l'enregistreur, l'aiguille est ainsi maintenue au contact de la couche de silice. L'aiguille est ensuite rinçée par 20 µl de chlorure de méthylène, le liquide de rinçage est ajouté au spot de départ.

La correspondance entre un pic en chromatographie en phase gazeuse et un spot en chromatographie sur plaque est rendue possible par la juxtaposition des deux modes de couplage.

La probabilité d'identification d'une substance est ainsi beaucoup plus grande que par la seule considération des temps de rétention, même sur colonnes de polarités différentes en chromatographie en phase gazeuse ou des Rf et des colorations en chromatographie sur couche mince.

c/ - Couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrophotométrie infrarouge.

Nous disposons d'un spectrophotomètre double faisceau Perkin Elmer 337, sans possibilité de couplage direct avec un chromatographe en phase gazeuse. Le piégeage à la sortie de la colonne préparative est fait dans un tube de verre en U de diamètre intérieur 1 mm, refroidi dans un mélange alcool-glace carbonique à — 20° C. Chaque substance est récupérée dans un piège différent.

Le piège est rincé avec quelques µl de tétrachlorure de carbone. Nous utilisons la micro-cellule D « Connecticut Instrument Corps » de 0,1 ml d'épaisseur et 4 mm² de section).

d/ - Couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse.

Comme dans le cas précédent, ce procédé est utilisé pour confirmer une identification préalable. Nous avons dans un premier temps isolé la fraction terpénique totale des extraits par chromatographie en phase gazeuse micro-préparative afin de concentrer suffisamment ces substances

Cette fraction terpénique étant concentrée, on injecte 0,5 µl sur colonne analytique FFAP programmée de 80° C à 200° C (2° C par minute)

avec 30 ml par minute de débit d'hélium utilisé comme gaz vecteur. L'appareil de chormatographie monocolonne PYE 104 est relié à un spectromètre de masse AEI type MS 12. Le couplage est fait par un séparateur BIEMAN chauffé à 180° C. Les spectres sont effectués à 70 eV avec un pouvoir de résolution de l'ordre de 1000. La température de la source est de 190° C.

D. - CONCLUSIONS

Le traitement du raisin par le fluorure de sodium et l'acide ascorbique suivi par une filtration stérilisante confèrent aux échantillons une stabilité satisfaisante.

L'extraction des substances volatiles des jus de raisin par le chlorure de méthylène a été choisie en fonction de la possibilité de purifier parfaitement ce solvant.

Les techniques de chromatographie en phase gazeuse et de chromatographie sur couche mince associées aux techniques spectrométriques permettent une identification des composés terpéniques du raisin. Nous les avons appliquées à l'identification des dérivés terpéniques dans les raisins de certaines variétés ; les résultats obtenus feront l'objet d'une prochaine publication.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ATTAWAY J.A., WOLFORD R.W. et EDWARDS G.J., 1965, **Anal. chem, 37,** 74-76.

AUSTERWEIL G., 1946, **Ind. Parfum., 1,** 195-199.

BARAUD J., 1961, **Bull. Soc. chim., 10,** 1874-1877.

BARAUD J. et MAURICE A., 1963, **Ind. alim. agr., 80,** 3-7.

BAYONOVE C. et CORDONNIER R., 1970 a, **Ann. Technol. agric., 19,** 79-93.

BAYONOVE C. et CORDONNIER R., 1970 b, **Ann. Technol. agric., 19,** 95-105.

BERTRAND A., 1968, **Thèse doctorat 3e cycle,** Bordeaux.

BERTRAND A., BOIDRON J.-N. et RIBÉREAU-GAYON P., 1967, **Bull. Soc. chim., 9,** 3149-3151.

BOIDRON J.-N., 1966, **Thèse doctorat 3e cycle,** Bordeaux.

BOMBEN J.L., MANNHEIM H.C. et MORGAN A.J., 1967, **Food Ind., 12,** 44-53

CORDONNIER R., 1956, **Ann. Technol. agric., 1,** 75-110.

DRAWERT F., 1960, **Vitis, 2,** 172-178.

DRAWERT F., 1960, **Vitis, 2,** 172-178.

DRAWERT F. et RAPP A., 1966, **Vitis, 5,** 351-376.

FLANZY M. et JOURET C., 1963, **Ann. Technol. agric., 12,** 39-50.

FLATH R.A, BLACK D.R., GUADAGNI D.G., Mc FADDEN W.H. et SCHULTZ T.H., 1967, **J. Agr. Food Chem., 15,** 29-35.

GALET P., 1956-1964, **Cépages et Vignobles de France,** Tomes I à IV, éd. Paul Déhan, Montpellier.

GEYER S. et MAYER R., 1965, **Z. chem, 5,** 308.

HARDY P.J., 1969, **J. Agr. Food Chem., 17,** 656-658

HARDY P.J., 1970, **Phytochem., 9,** 709-715.

Ter HEIDE R., 1968, **Z. Anal. Chem., 236,** 215-227.

HENNIG K. et VILLFORTH F., 1942, **Vorratspf. Lebensmitt., 5,** 181-189 et **7,** 313-333.

JAKOB L. et BACHMANN O., 1964, **Mitt. Klosterneuburg, 14,** 187-192.

KEPNER R.E. et WEBB A.D., 1961, **Am. J. Enol. Vitic, 12,** 159-174

KIRCHNER J.G., MILLER J.M. et KELLER G.J., 1951, **Anal. chem, 23,** 420-425

LEWIS Y.S., SANKARAN NAMBURIDI E. et PHILIP T., 1966, **Perf. Ess. Oil Record, 57,** 623-628.

MAARSE H. et Ten NOEVER de BRAUW M.C., 1966, **J. Food Sc., 31,** 951-955.

Mac GREGOR D.R., SUGISAWA H. et MATTHEWS J.S., 1964, **J. Food Sc., 29,** 448-455.

Mac LEOD W.D. et BUIGUES N.M., 1966, **J. Food Sci. 31,** 588-593.

MATTA M. et ASTEGIANO V., 1967, **Riv. Vitic., Enol., 20,** 165-172.

MECKE R. et de VRIES M., 1959, **Z. Anal. chem., 170,** 326-332.

MILLER J.M et KIRCHNER J.G., 1953, **Anal. chem., 25,** 1107-1110.

MILLEVILLE H.P. et ESKEW R.K., 1944, **Fruits Products J., 25,** 1107-1110.

MILLEVILLE H.P. et ESKEW R.K., 1946, **Western Canner Packer, 38.** 51.

MOSHONAS M.G. et SHAW P.E., 1971, **J. Agr. Food chem., 19,** 119-120

PEYNAUD E., 1937, **Rev. Viticult., 87,** 362-382.

PISSARNITSKI A.F., 1966, **Vinod. Vinograd. SSSR, 3,** 9-11.

POMONIS J.G., SEVERSON R.F. et FREEMAN P.J., 1969, **J. Chrom., 40,** 78-84.

POWER F.B. et CHESNUT V.K., 1920, **J. Am. Chem. Soc, 42,** 1509-1526

PRILLINGER F., HORWATITSCH H. et MADNER A., 1967, **Mitt. Klosterneuburg, 17,** 271-279.

PRILLINGER F. et MADNER A., 1968 a, **Mitt. Klosterneuburg, 18,** 1-9.

PRILLINGER F., MADNER A. et KOVACS J., 1968 b, **Mitt. Klosterneuburg, 18,** 98-105.

PRILLINGER F. et MADNER A., 1969, **Mitt. Klosterneuburg, 19,** 361-368.

PRILLINGER F. et MADNER A., 1970, **Mitt. Klosterneuburg, 20,** 202-205.

RANDERATH K., 1964, **Chromatographie sur couches minces,** éd. Gauthier-Villars, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., 1971, **Bull. O.I.V., 483,** 428-466.

RODOPULO A.K., BEZZUBOV A.A. et EGOROV I.A., 1970, **Prikl. Biokh, Mikro., 6,** 214-219.

STAHL E., 1962, **Dunnschicht. Chromatographie,** éd. Springer-Verlag, Berlin.

STEVENS K.L., BOMBEN J.L., LEE A. et Mc FADDEN W.H., 1966, **J. Agr. Food Chem., 14,** 249-252.

STEVENS K.L., BOMBEN J.L. et Mc FADDEN W.H., 1967, **J. Agr. Food Chem., 15,** 378-380.

STEVENS K.L., FLATH R.A., LEE A. et STERN D.J., 1969, **J. Agr. Food Chem., 17,** 1102-1106.

SUOMALAINEN H. et NYKANEN L., 1964, **Suomen Kemistil., 27,** 230-232.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1966 a, **Ind. Agrarie, 4,** 216-244.

USSEGLIO-TOMASSET L., ASTEGIANO V. et MATTA M., 1966 b, **Ind. Agrarie, 4,** 583-588.

USSEGLIO-TOMASSET L., 1969, **Riv., Vit. Enol.,** 223-242.

VAN WYCK C.J., KEPNER R.E. et WEBB A.D., 1967, **J. Food Sci., 32,** 660-664, 664-668, 669-674.

WEBB A.D. et KEPNER R.E., 1957, **Food Res., 22,** 384-395.

WEBB A.D., RIBÉREAU-GAYON P. et BOIDRON J.N., 1963, **C.R. Acad. agric.,** 115-123.

WEBB A.D., RIBÉREAU-GAYON P. et BOIDRON J.N., 1964, **Bull. Soc. Chim.,** 1415-1420.

WEBB A.D., KEPNER R.E. et MAGGIORA L., 1966, **Am. J. Enol. Vitic., 17,** 247-254.

WEBB A.D., 1968, **Conn. Vigne Vin, 2,** 13-24.

WENZEL K.W.O. et de VRIES J., 1968, **S. Afr. J. Agric. Sci., 11,** 273-280.

WEURMAN C., 1969, **J. Agr. Food Chem., 17,** 370-384.

WOLFORD R.W., ALBERDING G.E. et ATTAWAY J.A., 1962, **J. Agr. Food Chem., 10,** 297-301.