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

## II - RESULTATS

A. TERRIER et J.N. BOIDRON
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération
33400 Talence (France)

En utilisant les méthodes décrites dans un précédent article (TERRIER et BOIDRON, 1972) nous avons pu mettre en évidence et caractériser une fraction terpénique complexe dans les jus de raisins muscat et d'autres variétés aromatiques.

### 1. - MISE EN EVIDENCE PAR CHROMATOGRAPHIE

Une étude systématique d'une centaine de substances témoins nous laisse supposer l'existence dans le raisin muscat des substances signalées dans le tableau I dont les caractéristiques chromatographiques en phase gazeuse (figure 1) et sur couche mince ont été étudiées en détail. Il y a dans tous les cas correspondance entre le pic, la tache et ceux de la substance témoin.

La seule technique de chromatographie sur couche mince laisse planer un doute sur la présence de citronellol et de farnésol, mais dans tous les extraits analysés en chromatographie en phase gazeuse ces substances n'existent pas en quantité suffisante pour être détectées. La présence de limonène et de myrcène, dont les pics coïncident avec ceux de substances présentes dans les extraits en chromatographie en phase gazeuse, n'est pas confirmée par la chromatographie sur couche mince.

En ce qui concerne les oxydes du linalol, ils ne sont pas identifiables par chromatographie sur couche mince directe des extraits du fait de la faible intensité des colorations et surtout de la superposition avec d'autres taches ; en particulier les oxydes furanniques ont un Rf très proche de celui du géraniol et du nérol.

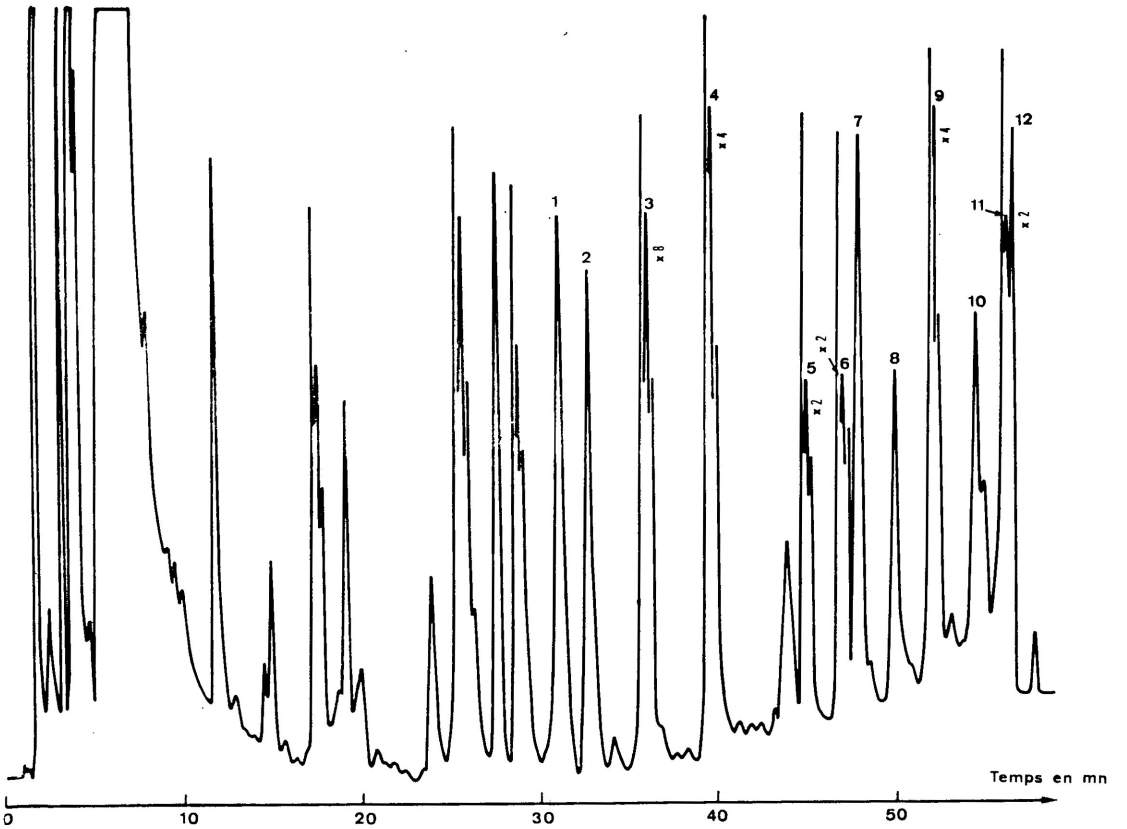



Fig. 1. — Chromatogramme d'un extrait par le chlorure de méthylène de raisin Muscat de Frontignan. Colonne FFAP. Débit d'azote 20 ml par minute. Température programmée de 65° C à 200° C à raison de 2° C par minute.
Identification des pics : 1 oxyde A; 2 oxyde B; 3 linalol; 4 substance X; 5 α-terpinéol; 6 oxyde C; 7 oxyde D; 8 nérol; 9 géraniol; 10 ionol; 11 phényl-2 éthanol; 12 substance Y.

# TABLEAU I

## Caractéristiques chromatographiques des dérivés terpéniques des raisins muscat.

I chromatographie en phase gazeuse
II chromatographie sur couche mince

| | | | Linalol | α - terpinéol | Nérol | Géraniol | Oxyde A | Oxyde B | Oxyde C | Oxyde D | Substance X |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | N° des pics (fig. 1) | | 3 | 5 | 8 | 9 | 1 | 2 | 6 | 7 | 4 |
| | Temps de rétention en minutes | FFAP 4m | 35 | 44 | 50 | 52 | 29 | 31 | 47 | 48 | 37 |
| | | Carb. 20M 6m | 42 | 51 | 56 | 59 | 35 | 37 | 53 | 54 | 46 |
| | | SF 96 6m | 28,5 | 35 | 38 | 42 | 26,7 | 28 | 33 | 33 | — |
| II | COMPOSITION | n° du solvant | | | | | | | | | |
| Distance parcourue par la substance x 100 / Distance parcourue par le linalol (témoin) | Benzène | 1 | 100 | 78 | 75 | 75 | | | | | 92 |
| | Benzène 95-Acétate d'éthyle 5 | 2 | 100 | 70 | 70 | 66 | | | | | 96 |
| | Benzène 90-Acétate d'éthyle 10 | 3 | 100 | 77 | 80 | 73 | | | | | 102 |
| | Benzène 85-Acétate d'éthyle 15 | 4 | 100 | 78 | 80 | 76 | | | | | 100 |
| | Benzène 80-Acétate d'éthyle 20 | 5 | 100 | — | 85 | 81 | | | | | 97 |
| | Hexane | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | | | | | 100 |
| | Hexane 95-Acétate d'éthyle 5 | 7 | 100 | 50 | 50 | 50 | | | | | 93 |
| | Hexane 90-Acétate d'éthyle 10 | 8 | 100 | 53 | 47 | 47 | | | | | 88 |
| | Hexane 85-Acétate d'éthyle 15 | 9 | 100 | 66 | 56 | 45 | | | | | 90 |
| | Hexane 80-Acétate d'éthyle 20 | 10 | 100 | 79 | 73 | 66 | | | | | 92 |
| | Acétate d'éthyle | 11 | 100 | 96 | 96 | 92 | | | | | 102 |
| | Benzène 1-Chloroforme 1 | 12 | 100 | 78 | 78 | 78 | | | | | 95 |
| | Chloroforme | 13 | 100 | 75 | 63 | 63 | | | | | 93 |
| | Ether de pétrole 85-Acétate d'éthyle 15 | 14 | 100 | 69 | 62 | 62 | | | | | 93 |
| | Chloroforme 30-Acide acétique 1 Tétrachlorure de carbone 69 | 15 | 100 | 70 | 70 | 70 | | | | | 100 |
| | Acétate d'éthyle 20-Acide acétique 1-Cyclohexane 79 | 16 | 100 | 90 | 85 | 81 | | | | | 107 |
| | Benzène 40-Méthanol 2 | 17 | 100 | 77 | 74 | 69 | 81 | 81 | 50 | 50 | 100 |
| | Chloroforme 90-Acétate d'éthyle 10 | 18 | 100 | 74 | 77 | 77 | | | | | 100 |
| | Chloroforme 95-Acétate d'éthyle 5 | 19 | 100 | 79 | 79 | 79 | | | | | 100 |
| | Chloroforme 85-Carbonate d'éthyle 15 | 20 | 100 | 70 | 83 | 73 | | | | | 100 |
| Coloration après pulvérisation | Vanilline sulfurique 1/2 heure | | V | Bv | Vs | V | Vj | Vj | Vj | Vj | Bl |
| | Vanilline sulfurique 12 heures | | Vj | B | Vj | Vj | L de V | | L de V | | Bl |
| | Anisaldéhyde | | Jv | Rs | Jv | Jv | Vc | Vc | Vc | Vc | M |

V = vert ; Vj = vert jaunâtre ; Vc = vert clair ; M = mauve ; Rs = rose saumon ; L de V = lie de vin ; Bl = bleu lavande ; Br = brun ; Jv = jaune verdâtre.

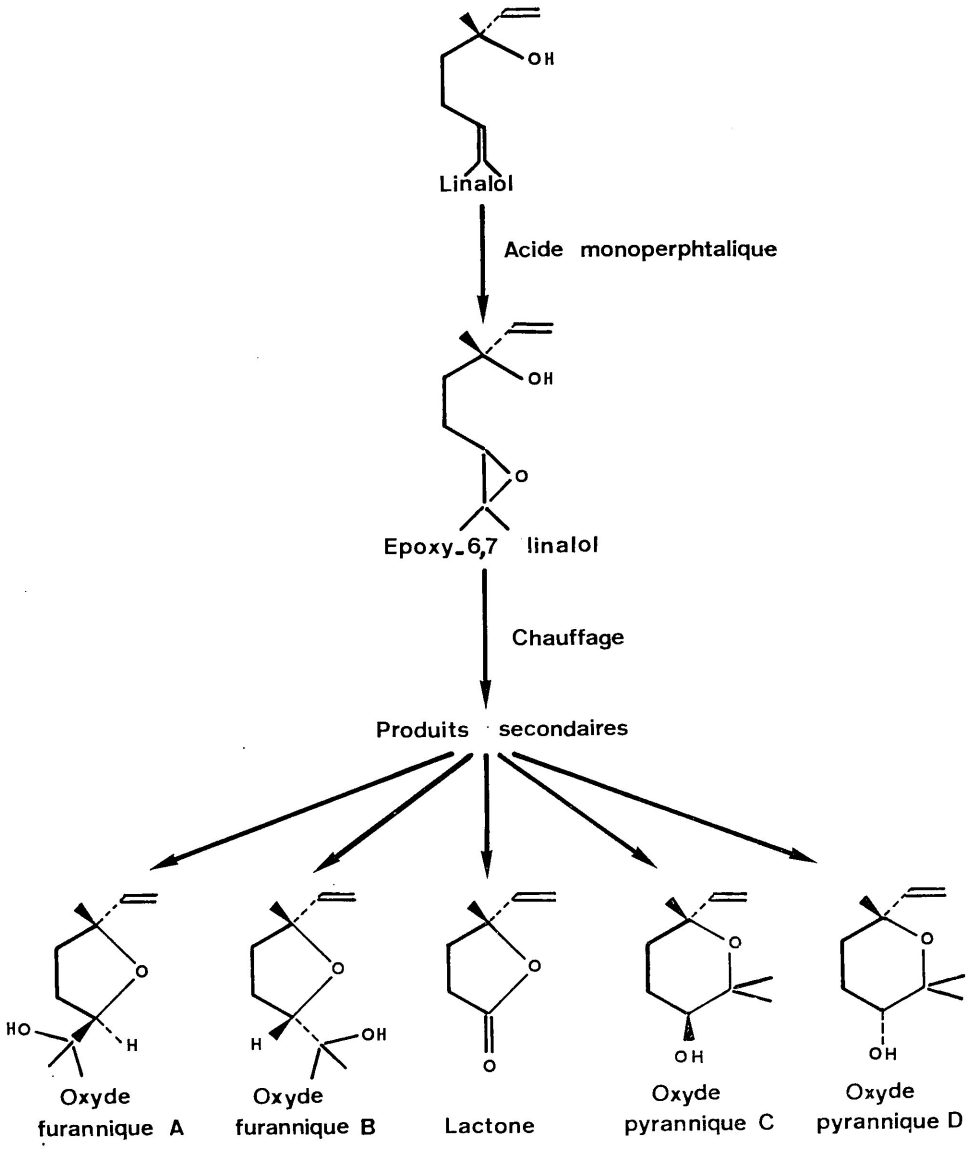


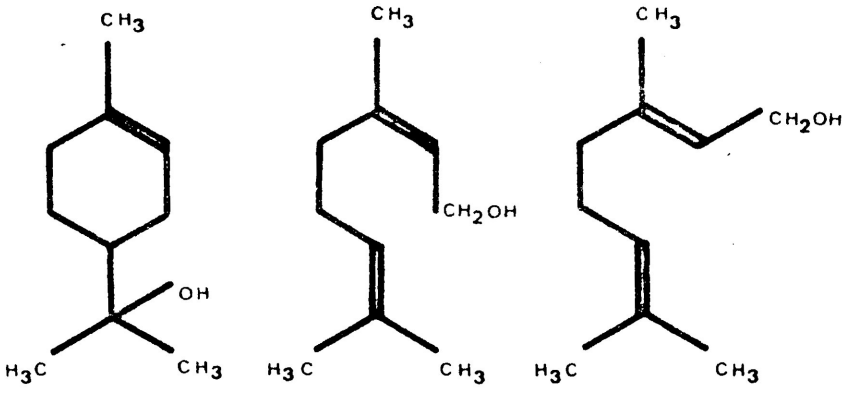

Fig. 2. — Structure et préparation des oxydes du linalol.

Oxyde A = **trans**-méthyl-2 vinyl-2 (hydroxy-1' méthyl-1' éthyl)-5 tétrahydrofuranne.

Oxyde B = **cis**-méthyl-2 vinyl-2 (hydroxy-1' méthyl-1' éthyl)-5 tétrahydrofuranne.

Oxyde C = **trans**-vinyl-2 triméthyl-2,6,6 hydroxy-5 tétrahydropyranne.

Oxyde D = **cis**-vinyl-2 triméthyl-2,6,6 hydroxy-5 tétrahydropyranne.




**α Terpinéol** **Nérol** **Géraniol**

Fig. 2 bis. — Formules d'alcools terpéniques présents dans les raisins muscats.

## 2. - SUBSTANCES DE REFERENCE

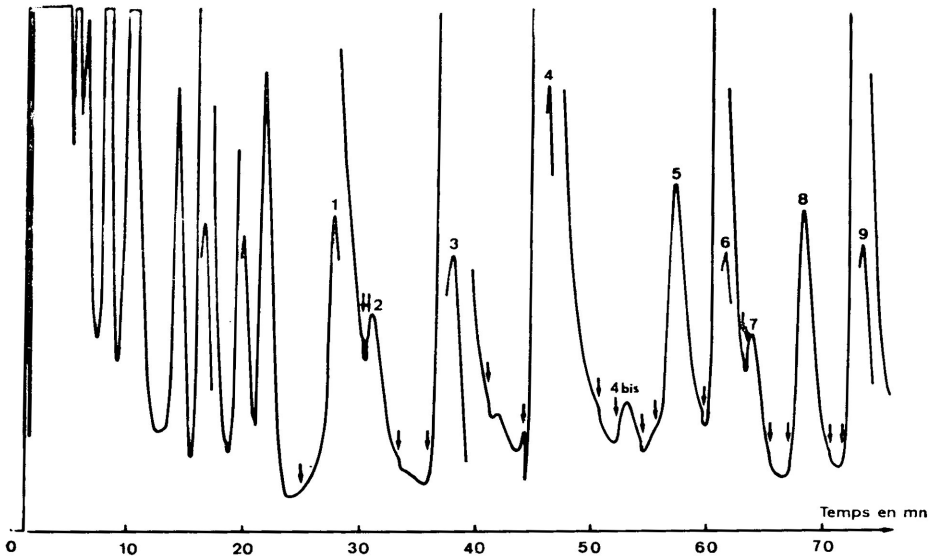
Nous avons utilisé les dérivés terpéniques du commerce que nous avons dû parfois purifier par chromatographie en phase gazeuse préparative.

Les oxydes du linalol sont préparés par action de l'acide monoperphtalique sur le linalol, selon la méthode de NAVES et BACHMANN (1945) reprise par FELIX et **al.** (1963).

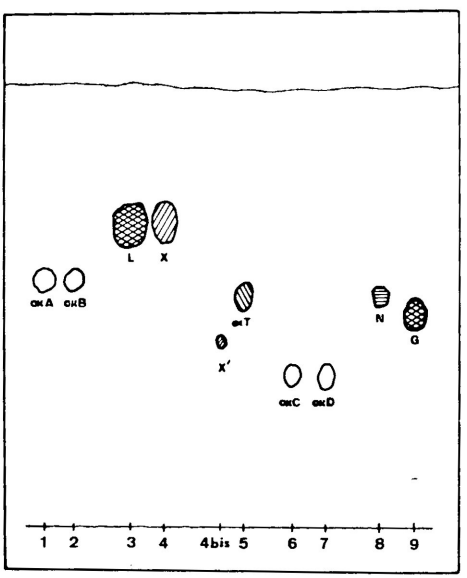
La figure 2 donne le schéma des réactions de formation des oxydes du linalol ainsi que leur structure. Les formules des autres substances identifiées sont représentées sur la figure 2 bis.

## 3. - IDENTIFICATION

Les expériences précédentes conduisent à une grande probabilité d'identification de huit composés terpéniques. Il était cependant nécessaire d'effectuer une identification plus rigoureuse. Une telle identification suppose d'abord de démontrer que la même substance est effectivement responsable d'un pic en chromatographie en phase gazeuse et d'un tache en chromatographie sur couche mince ; les couplages chromatographiques permettent une telle identification. Enfin, pour confirmer les identifications préalables nous avons réalisé, chaque fois que cela était possible, les spectres infrarouge et de masse des dérivés terpéniques du raisin muscat et confirmé qu'ils étaient identiques à ceux des substances de référence.




3 a




3 b

Fig. 3 a : Chromatogramme d'un extrait de raisin Muscat d'Alexandrie sur colonne préparative FFAP. Débit d'azote : 80 ml par minute. Isotherme de température de 20 mn à 130° C puis montée à 180° C à raison de 1° C par minute. Les flèches indiquent le début et la fin de chaque collection.

Fig. 3 b : Chromatographie sur plaque de chaque fraction isolée à la sortie du chromatographe en phase gazeuse. Identification : 1 oxyde A; 2 oxyde B; 3 linalol; 4 substance X; 4 bis inconnu, 5 α-terpinéol; 6 oxyde C; 7 oxyde D; 8 nérol; 9 géraniol.

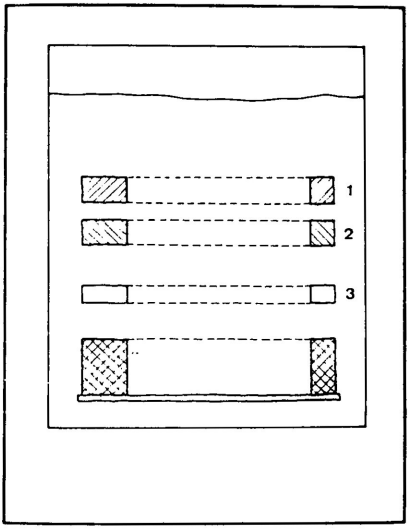



Fig.4a

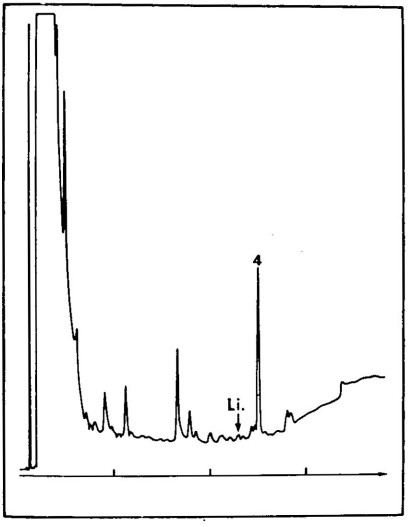



Fig.4b

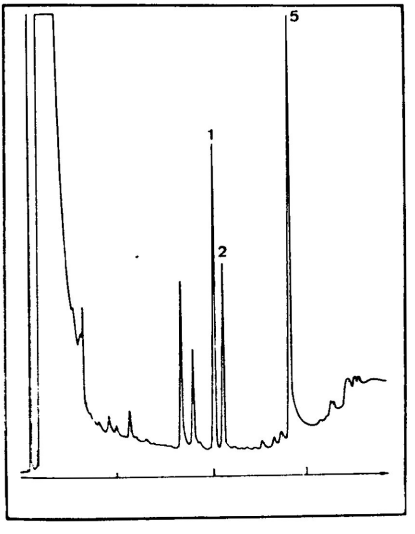



Fig.4c

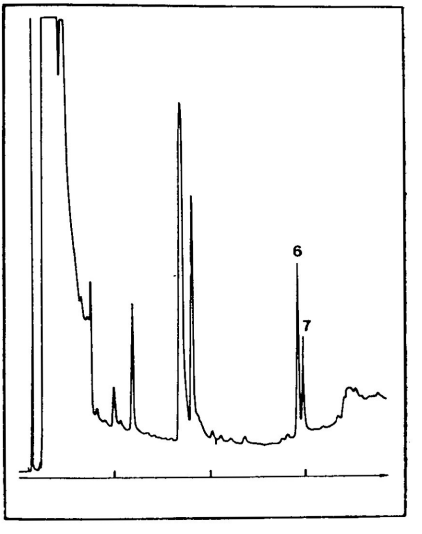



Fig.4d

Fig. 4 a : Chromatographie préparative sur couche mince d'un extrait de jus de muscat du commerce dans le mélange benzène 40 - méthanol 2.

Fig. 4 b : Chromatographie en phase gazeuse de l'éluat n° 1.

Fig. 4 c : Chromatographie en phase gazeuse de l'éluat n° 2.

Fig. 4 d : Chromatographie en phase gazeuse de l'éluat n° 3.

Identification des pics : 1 oxyde A; 2 oxyde B; 4 substance X; 5 α-terpinéol; 6 oxyde C; 7 oxyde D.

**a) Couplages chromatographiques.**

Nous avons réalisé le couplage chromatographie en phase gazeuse-chromatographie sur couche mince avec le mode opératoire précédemment décrit (TERRIER et BOIDRON, 1972) on recueille directement les fractions n° 1, 2, 3, 4, etc... (figure 3a) ; la chromatographie sur couche mince, dans le mélange benzène 40 - méthanol 2 de chacune d'elles permet les identifications indiquées sur la figure 3b.

Le couplage inverse, c'est-à-dire la chromatographie sur couche mince suivie de la chromatographie en phase gazeuse, a été réalisée sur un jus de muscat du commerce ne contenant pratiquement pas de linalol, mais une quantité relativement importante de six substances. Pour cinq d'entre elles, les temps de rétention en chromatographie en phase gazeuses coïncident avec ceux de l'α-terpinéol, des quatre oxydes du linalol, et d'une substance inconnue (pic n° 4, figure 1). La chromatographie préparative sur couche mince nous a permis d'isoler plusieurs bandes (figure 4a).

— Bande n° 1 : Rf du linalol, coloration bleu lavande.

— Bande n° 2 : Rf de l'α-terpinéol et des oxydes furanniques, coloration bleuâtre.

— Bande n° 3 : Rf des oxydes pyranniques du linalol, coloration vert jaunâtre.

L'élution par l'acétone de la silice récupérée après grattage des plaques et la chromatographie en phase gazeuse des éluats nous permettent de constater que, dans l'éluat de la bande n° 1 (figure 4b), la substance responsable de la coloration bleu lavande a un temps de rétention supérieur à celui du linalol et comparable à celui du pic n° 4 (figure 1) ; d'autre part le linalol est absent de cet extrait, son emplacement théorique est indiqué par le symbole « Li » sur la figure 4b.

L'éluat de la bande n° 2 contient essentiellement trois substances dont les Rf et les temps de rétention coïncident avec ceux de l'α-terpinéol et des oxydes furanniques A et B (figure 4c).

Enfin, la chromatographie de l'éluat de la bande n° 3 laisse apparaître deux substances dont les temps de rétention coïncident avec ceux des oxydes pyranniques C et D (figure 4d).

On remarque (figures 4b, 4c, 4d) la présence constante de 2 pics correspondant sûrement à l'hexanol et à l'hexène-2 ol-1 ; ces deux substances abondantes dans le raisin donnent une traînée non révélée sur la plaque chromatographique et se retrouvent dans les éluats.

La juxtaposition des deux méthodes de couplage et la considération des spectres de masse permettent donc d'affirmer sans ambiguïté que l'α-terpinéol (pic n° 5 de la figure 1), les oxydes furanniques A et B (pics n° 1 et 2 de la figure 1) et pyranniques C et D du linalol (pics n° 6 et 7 de la figure 1) sont présents dans les extraits de raisin muscat.

Le linalol n'est pas identifié par le second mode de couplage car il était pratiquement absent du jus de commerce mis en œuvre. Néanmoins, il sera identifié avec certitude à l'aide des méthodes spectrométriques dans d'autres extraits de raisin muscat. En outre, les expériences décrites dans ce paragraphe ont permis de montrer de façon précise la présence en quantité relativement importante d'une substance X ayant des caractéristiques voisines de celles du linalol.

**b) Confirmation des résultats par utilisation des méthodes spectrométriques**

Bien que les méthodes chromatographiques apportent une certitude d'identification suffisante, nous avons réalisé le spectre infrarouge du linalol, substance quantitativement la plus importante de la fraction terpénique du raisin (dans la plupart des cas) avec le mode opératoire précédemment décrit (TERRIER et BOIDRON, 1972). Le spectre du linalol obtenu à partir du jus de muscat est identique à celui obtenu avec le produit pur ; son obtention a nécessité une trentaine d'injections de 50 µl environ d'extrait par le chlorure de méthylène. Il ne nous a pas été possible matériellement de réaliser le spectre infrarouge des autres substances, en plus faible quantité.

Par contre, avec un chromatographe en phase gazeuse couplé avec un spectromètre de masse, les quantités nécessaires pour obtenir un spectre sont beaucoup plus faibles. Nous avons donc pu obtenir le spectre de douze substances de la « fraction terpénique » de l'extrait de raisin muscat et les comparer à ceux de substances de référence réalisés dans les mêmes conditions. Nous avons confirmé la présence de quatre alcools monoterpéniques (linalol, α-terpinéol, géraniol et nérol) et de quatre oxydes furanniques et pyranniques du linalol dans les extraits de muscat ; également nous retrouvons le phényl-2 éthanol (pic n° 11 de la figure 1).

Enfin nous avons réalisé les spectres de masse de deux autres substances (pics n° 4 et 12 de la figure 1) qui correspondent à la substance inconnue X déjà mentionnée et à une autre substance Y également inconnue

Le 12e spectre réalisé rorrespondant au pic n° 10 (figure 1) a été identifié à celui de l'ionol (di t-butyle-1,3 hydroxy-2 méthyl-5 benzène) qui est peut-être une impureté du solvant.

Nous ne pouvons pas être certains que la lactone (vinyl-2 méthyl-2 tetrahydrofuranne one-5) est absente des jus de raisins aromatiques ; en effet son temps de rétention est très proche de celui de l'$\alpha$-terpinéol et, dans certains extraits, un pic ayant le même temps de rétention que la lactone est présent, mais nous n'avons pas pu l'identifier avec certitude.

## 4. - PRESENCE DE SUBSTANCES NON IDENTIFIEES

La chromatographie sur plaque dans le mélange benzène 40 - méthanol-2 d'un extrait de jus de muscat du commerce a montré la présence d'une tache dont le Rf est très voisin de celui du linalol, mais dont les réactions colorées avec l'anisaldéhyde et la vanilline sulfurique sont différentes, mauve au lieu de jaune verdâtre dans le premier cas et bleu lavande au lieu de vert dans le second cas. Cette substance X est absente des extraits de Sémillon et de Merlot.

La juxtaposition des deux modes de couplage chromatographiques nous permet d'affirmer que cette substance X, de Rf très proche de celui du linalol, de coloration bleu lavande après pulvérisation à la vanilline sulfurique est bien celle correspondant au pic n° 4 de la figure 1.

Nous avons indiqué dans le tableau I les Rf relatifs de cette substance X par rapport au linalol dans 20 solvants différents ; dans tous les cas ces Rf sont très proches de ceux du linalol.

D'autre part, l'analyse olfactive à la sortie du chromatographe préparatif permet d'attribuer à cette substance X une odeur très fine de fleur de tilleul. La chromatographie des constituants du tilleul, tels le farnésol (KERSCHBAUM, 1913 ; NAVES et MAZUYER, 1939), l'eugénol (BERNASCONI et GEBISTORF, 1968) ne permet pas d'identifier ces substances au corps X.

Enfin, nous avons réalisé le spectre de masse de ce corps ; le tableau II indique l'importance relative des pics caractéristiques. De

même une autre substance inconnue Y (pic n° 12, figure 1) difficile à séparer du phényl-2 éthanol figure dans ce tableau. Son spectre de masse présente certaines analogies avec celui de la substance X.

**TABLEAU II**

**Importance relative des pics les plus intenses des spectres de masse des substances inconnues des extraits de muscat**

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Substance X | 71 | 82 | 43 | 67 | 41 | 28 | 55 | 39 |
| | 1000 | 615 | 308 | 277 | 169 | 105 | 98 | 92 |
| Substance Y | 82 | 71 | 43 | 67 | 41 | 85 | 27 | 83 |
| | 1000 | 800 | 475 | 375 | 125 | 84 | 78 | 76 |

Nous pouvons affirmer que la substance X n'est pas un artefact dû à la chromatographie en phase gazeuse ou à la méthode d'extraction pour les raisons suivantes :

a/ L'analyse en phase gazeuse d'une solution alcoolique d'alcools terpéniques (linalol, α-terpinéol, géraniol, nérol) et d'oxydes du linalol ne présente pas ce pic.

b/ L'extrait d'une solution aqueuse de ces mêmes dérivés terpéniques ne contient également pas cette substance.

c/ La chromatographie en phase gazeuse et sur couche mince d'extraits de Muscat, par le chlorure de méthylène ou par le pentane, présentent le pic et la tâche relatifs à la substance X, alors que des extraits de Sémillon, Grenache, Merlot ne contiennent pas cette substance.

d/ L'extraction par démixtion (BOIDRON et TERRIER, 1972), ne faisant pas appel à une grande quantité de solvant ni au chauffage, permet de mettre en évidence ce corps X.

Toutes ces constatations nous permettent de penser que la substance X, toujours présente avec les alcools terpéniques et les oxydes de linalol des raisins muscat, appartient certainement à la famille des terpènes. Nous pouvons également supposer, par comparaison avec les chromatogrammes publiés par PRILLINGER et MADNER (1969, 1970), que la substance X est bien le « composant muscat » signalé par ces auteurs. Le spectre infrarouge et l'analyse élémentaire, lorsque nous disposerons

de quantités suffisantes, nous permettront de mieux la caractériser et probablement de l'identifier.

## 5. - PRESENCE DES TERPENES DANS LES RAISINS DE DIVERS CEPAGES.

Les identifications précédentes ont été réalisées sur des raisins de Muscat de Frontignan et de Muscat d'Alexandrie. Les huit dérivés terpéniques identifiés et la substance X sont présents dans les raisins des autres variétés muscat analysées : Italia, Muscat de Saint-Vallier, Muscat de Hambourg, Muscat de Terracina, Muscat Reine des Vignes, Muscat Fleur d'Oranger et Muscat Ottonel.

Ces substances sont présentes en plus faible quantité dans les raisins de variétés aromatiques non muscat : Riesling, Sylvaner, Müller-Turgau, Gewürtztraminer.

Nous avons également identifié linalol et géraniol ainsi que des traces d'α-terpinéol et de substance X dans le Dabouki et le Ravat 6 (CHARDONNAY et SEIBEL, 5474) considéré comme cépage relativement aromatique. Enfin les dérivés terpéniques, s'il y en a, ne sont pas présents en quantité suffisante pour être détectés par les méthodes employées dans les variétés non aromatiques analysées : Grenache, Chasselas, Merlot, Dattier de Beyrouth, Ugni Blanc.

## CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons identifié les dérivés terpéniques dans les raisins et les vins de **Vitis vinifera,** en distinguant les Muscats, les variétés aromatiques non muscat et les variétés non aromatiques.

1°) Notre travail d'identification confirme d'abord la présence du linalol et de l'α-terpinéol couramment admises dans les extraits de muscat. Cependant certains jus de muscat du commerce ne présentent pas de linalol en quantité décelable ; dans ce cas ils sont particulièrement riches en oxydes furanniques et pyranniques de cette substance. Nous avons fait cette observation dans deux jus de même origine mais d'années différentes ; on peut donc penser que la transformation du linalol en oxydes est dûe aux conditions de préparation ou de conservation.

2°) Le géraniol, dont la présence avait été suggérée par CORDONNIER (1956) et STEVENS et **al.** (1966), et le nérol (STEVENS et **al.**, 1966)

sont présents dans tous les jus de muscat analysés, ainsi que dans les variétés aromatiques non muscat.

3°) On pourrait supposer que la présence d'oxydes du linalol est dûe, soit à une transformation du linalol lors de l'injection dans le chromatographe, soit à une oxydation provoquée par le traitement des raisins au cours de l'extraction et de la concentration. Or, après injection de linalol pur dans le chromatographe, on observe le seul pic relatif à cette substance ; de même, une solution synthétique d'alcools terpéniques (linalol, α-terpinéol, nérol, géraniol), traitée dans les mêmes conditions que les raisins de muscat, ne présente pas les pics des oxydes du linalol.

Il apparaît donc comme une certitude que ces oxydes sont présents naturellement dans les raisins contenant du linalol ; il est en effet très peu probable qu'une oxydation puisse se produire durant les quelques minutes qui précèdent la mise en contact des grains entiers avec l'acide ascorbique (anti-oxydant) et le fluorure de sodium (blocage des systèmes enzymatiques).

4°) Le limonène, le myrcène et le farnésol signalés dans certains travaux, ne sont pas présents en quantité suffisante pour être identifiés dans les raisins que nous avons analysés. Il en est de même pour la β-ionone

5°) La lactone (vinyl-2 méthyl-2 téthydrofuranne one-5) n'a pu être identifée avec certitude. La présence de cette substance, jamais signalée dans la littérature, est cependant probable dans certains jus de raisins.

6°) Une substance inconnue X est présente dans les raisins aromatiques. Cette substance n'est pas un artefact, car elle est absente dans les raisins non aromatiques et dans les solutions synthétiques de terpènes traitées dans les mêmes conditions ; certains faits semblent indiquer qu'elle proviendrait d'une transformation des alcools monoterpéniques acycliques. Nous pensons qu'il s'agit du « constituant muscat » signalé par PRILLINGER et MADNER en 1969. Nous n'avons pas pu identifier cette substance à odeur de fleur de tilleul, mais nous en donnons les caractéristiques chromatographiques et le spectre de masse.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERNASCONI R. et GEBISTROF J., 1968, **Pharm. Acta Helv., 43,** 677-688.

BOIDRON J.-N. et TERRIER A., 1972 (en préparation).

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

FELIX D., MELERA A., SEIBL J. et KOVATS E., 1963, **Helv. Chim. Acta, 46,** 1513-1536.

KERSCHBAUM, 1913, **Ber. d. Chem. Ges., 46,** 1732.

NAVES Y.R. et MAZUYER G., 1939, **Les Parfums naturels,** ed. Gauthier-Villars, Paris.

NAVES Y.R. et BACHMANN P., 1945, **Helv. Chim. Acta, 28,** 1227-1230.

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

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

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

TERRIER A., 1972, Les composés terpéniques dans l'arôme des raisins et des vins de certaines variétés de **Vitis vinifera ;** Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux.

TERRIER A. et BOIDRON J.-N., 1972, **Conn. Vigne, Vin, 6,** 69-85.