CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA DETERMINATION DE L'ETAT DE CONDENSATION DES TANINS DES VINS ROUGES *

Y. GLORIES et P. RIBEREAU-GAYON
Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence.

INTRODUCTION

Les tanins du raisin et du vin sont des substances très importantes en œnologie car elles contribuent pour une large part à la couleur et aux caractères organoleptiques des vins rouges. La connaissance de la structure des molécules de tanin présente un intérêt certain car elle doit permettre, entre autre, de préciser l'évolution de la couleur et des caractères du vin au cours du vieillissement. De nombreux auteurs ont étudié ce problème, en particulier SOMERS (1968), JURD (1969), JURD et SOMERS (1970), SOMERS (1971), GLORIES (1971).

Le tanin du vin est constitué d'un mélange de flavanes (leucoanthocyanes et catéchines) plus ou moins polymérisées, appelées flavolanes ; leur masse moléculaire est comprise approximativement entre 600 et 3 000 (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; SWAIN, 1962). Bien qu'il soit maintenant certain que les molécules de leucoanthocyanes jouent un plus grand rôle que celles de catéchines, la structure des oligomères n'est pas bien élucidée. Plusieurs hypothèses sur le mode de condensation ont été avancées mais aucune n'a été totalement démontrée : liaison étheroxyde (DREWES et ILSLEY, 1969), liaison type acétal (ROLLMAN, VANCRAENENBROECK et LONTIE, 1966), liaison C_4-C_8, la plus probable. En outre, JURD (1969) a démontré la possibilité d'intervention des molécules d'anthocyanes dans la polymérisation des flavanes et SOMERS (1971) a proposé l'intervention d'une copolymérisation des anthocyanes et des tanins au cours de la conservation du vin.

* Ce travail constitue le condensé d'une thèse de doctorat de 3ème cycle en chimie, mention œnologie, soutenue par Yves GLORIES à l'Université de Bordeaux I, le 12 Novembre 1971.

La chimie végétale ne dispose d'aucune méthode adaptée à l'étude de la structure de ces molécules ; aussi nous avons été amenés à imaginer des méthodes originales permettant l'extraction des composés phénoliques totaux, la séparation des tanins et des anthocyanes par filtration sur gel Sephadex, enfin la mesure directe de la masse moléculaire moyenne par une méthode cryométrique. Egalement l'utilisation de l'ultrafiltration sur différentes membranes nous a permis de préciser l'encombrement stérique des molécules de tanins de différents vins (RIBEREAU-GAYON et GLORIES, 1971).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. - EXTRACTION DES POLYPHENOLS DU VIN.

Trois techniques sont possibles et ont été mises en œuvre dans cette expérimentation.

— Extraction au moyen des sels de plomb (SOMERS, 1966). L'opération se déroule comme une défécation classique ; les polyphénols sont déplacés du complexe plomb-polyphénols par les ions chlorhydrique ou sulfurique ajoutés en solution alcoolique au précipité

— Extraction des polyphénols, à partir du résidu d'évaporation du vin, à l'aide du méthanol-chlorhydrique ; les sels précipitent et après centrifugation le surnageant est concentré.

— Démixtion directement à partir du vin. L'addition d'un solvant (éther, acétone ou éthanol) et d'un sel (sulfate d'ammonium, sulfate de magnésium, phosphate monosodique) provoquent la formation d'une phase aqueuse et d'une phase organique qui a, vis-à-vis des substances à extraire, le plus grand pouvoir solvant. Le grand intérêt de cette méthode est de fournir un extrait pratiquement exempt de sucres (SINGLETON, 1961 ; DUBOIS, 1969 ; BERTRAND, 1971 ; BOIDRON, travaux non publiés).

La première technique utilisant les sels de plomb est satisfaisante, bien que le milieu acide, servant à déplacer le plomb, risque de produire des transformations de la structure des tanins. L'extraction par le méthanol semble être, dans le cas du vin, la technique la plus rapide et la plus commode ; c'est celle qui risque le moins de provoquer des variations de structure des molécules. Enfin, la démixtion est très intéressante dans le cas de solutions sucrées (extraction des tanins des baies de raisin)

II. - SEPARATION ET FRACTIONNEMENT DES POLYPHENOLS.

La filtration sur gel Sephadex a permis la séparation des tanins et des anthocyanes ; mais cette technique n'a pas donné les résultats qui pouvaient être escomptés pour réaliser le fractionnement des polymères, c'est-à-dire des flavolanes constitutives des tanins.

1° Principe de la filtration sur gel Sephadex.

Sephadex est un nom commercial qui désigne un produit granulé formé de petites perles de polysaccharides (Dextrane). Placé dans un solvant, il gonfle plus ou moins selon la qualité et la série auxquelles il appartient, en formant un gel dont la surface présente des pores ; les dimensions de ces derniers sont fonction du taux de gonflement. Les séparations sur Sephadex reposent sur le principe des tamis moléculaires. Les molécules de dimensions supérieures aux plus gros pores ne peuvent pas pénétrer dans les perles de gel ; elles le traversent dans la phase liquide mobile et quittent la colonne les premières. Par contre, les molécules plus petites diffusent plus ou moins dans le gel, suivant leur taille et leur forme ; par conséquent leur déplacement est retardé (fig. 1).

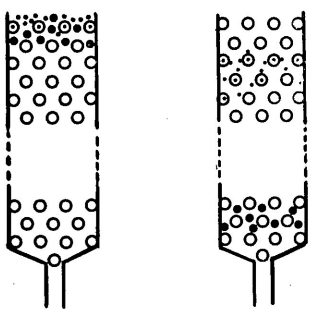


Fig. 1. — Filtration sur gel d'un mélange de deux types de molécules.
O gel
● grosses molécules exclues du gel
. . petites molécules analysées par le gel.

Dans le gel, les macromolécules de dextrane modifié sont réticulées pour former un réseau tridimensionnel de chaînes de polysaccharides. Cette réticulation se fait par formation de liaisons transversales entre les chaînes. Grâce à sa teneur en groupes hydroxyles, il est très hydrophile, gonflant dans l'eau ou dans toute solution électrolytique. Il existe plusieurs catégories de gel suivant la capacité d'absorption du solvant (l'eau étant prise comme référence) et plusieurs granulations ; les plus fines correspondent à la meilleure résolution.

Deux phénomènes gênent le fractionnement des polyphénols du vin :

— Les substances polyphénoliques présentent une grande affinité pour le Sephadex ;

— La matrice du gel contient un petit nombre de groupes carboxyles qui, lorsque la force ionique est faible, produisent des interactions avec les charges de soluté.

Il faut donc rechercher les solvants et les conditions de pH permettant de se rapprocher le plus possible du tamisage moléculaire. Ce sont des mélanges de solvants organiques (Acétone, Ethanol ou Méthanol) et d'eau à pH acide (de l'ordre de 2). Ils sont utilisés pour faire gonfler le Sephadex et servent également d'éluant ; la phase mobile qui fait migrer les substances a donc la même composition que la phase stationnaire, évitant ainsi les perturbations du gel dues au changement de solvant.

Pour éviter, lors du gonflement, d'emprisonner les bulles d'air dans la matrice du gel, nous opérons avec le mélange hydroalcoolique de la façon suivante : le Sephadex choisi en fonction de la séparation que l'on veut effectuer, est placé dans une fiole à vide, le bouchon étant muni d'un entonnoir à robinet. Le vide établi, le solvant est ajouté goutte à goutte sur le gel, brassé par un agitateur magnétique jusqu'à obtention d'une pâte très liquide ; on le laisse reposer pendant une nuit à la pression normale.

Le remplissage de la colonne doit être très homogène et réalisé en une seule opération. La stabilisation du gel est obtenue après passage de deux à trois fois son volume de solvant. L'échantillon déposé à la partie supérieure est alors recouvert avec grand soin d'éluant, en évitant au maximum la diffusion de l'un dans l'autre et la colonne est mise en communication avec le réservoir d'éluant.

Les éluats sont collectés dès que l'échantillon pénètre dans le gel et la concentration en substance étudiée est déterminée sur chaque fraction. Nous pouvons tracer une courbe d'élution en portant en ordonnée les concentrations et en abscisse le volume ou le numéro de chaque fraction (fig. 2).

La courbe est surtout caractérisée par trois valeurs : le volume d'élution de la substance, le volume vide du gel et le volume total du gel.

— Le volume d'élution Ve est le volume de solvant que l'on recueille entre l'introduction de l'échantillon sur la colonne et son apparition dans

l'éluant. Plus la molécule est retardée, plus le volume d'élution est grand ; pour déterminer sa valeur, on note le volume correspondant au sommet du pic d'élution.

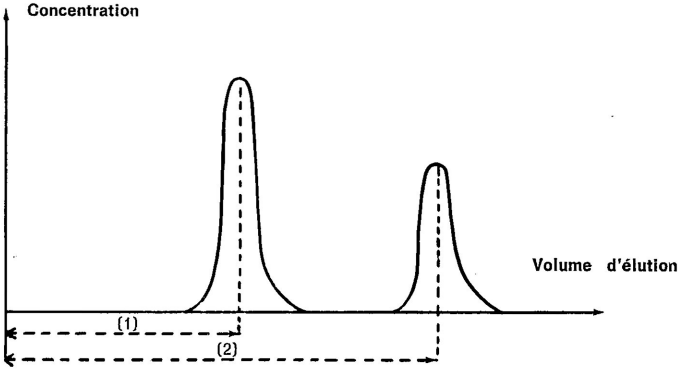


Fig. 2. — Courbe d'élution théorique d'un mélange de deux types de molécules.
(1) volume d'élution des grosses molécules exclues du gel (confondu avec le volume vide du gel)
(2) volume d'élution des petites molécules analysées par le gel.

— Le volume vide Vo est le volume d'élution d'une substance totalement exclue du gel qui migre sans être retardée. C'est également le volume du liquide libre entre les perles de gel.

— Le volume total du gel Vt est le volume total occupé par le gel dans la colonne.

Les deux dernières valeurs peuvent légèrement varier avec la pression de travail qui comprime le gel et diminue Vo et Vt.

2° **Séparation des polyphénols.**

Le gel utilisé est le Sephadex G 25 fin gonflé avec un mélange hydro-alcoolique légèrement acide (SOMERS, 1964). Les polyphénols extraits par les méthodes précédentes sont concentrés et déposés à la partie supérieure du gel ; la colonne est éluée, le même solvant servant également d'éluant. Les densités optiques des éluats collectés sont mesurées à 540 nm, caractéristique des anthocyanes, et 280 nm, caractéristique de tous les composés phénoliques.

L'étude a été réalisée sur des vins d'âges différents (fig. 3). Les courbes d'élution présentent un ou plusieurs pics selon l'âge du vin. Le premier, présent dans les trois cas, a un volume d'élution correspondant au volume vide du gel ; les molécules de ce pic sont donc volumineuses,

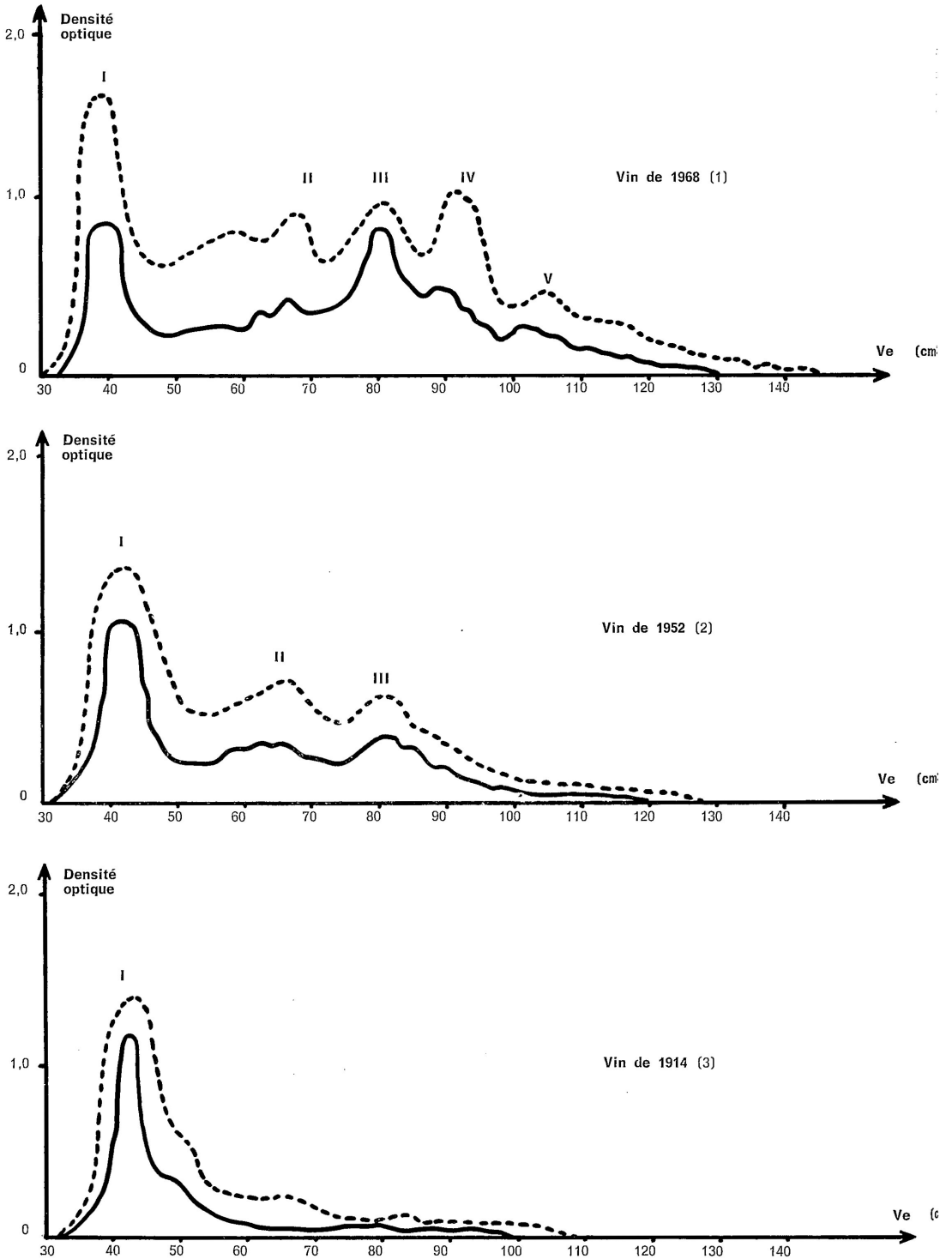


Fig. 3. — Courbe d'élution de différents vins. Sephadex G 25 fin ; Eluant : H_2O, éthanol, HCl

Colonne : 1,5 x 50 cm

———— Courbe à 540 nm

— — — — — Courbe à 280 nm

de masse moléculaire supérieure à la limite d'exclusion du gel. Elles sont également très nombreuses (densités optiques très élevées) et existent quels que soient le vin, l'âge et le mode de vinification. Comme SOMERS (1966) l'a montré, cette première bande correspond aux molécules de tanins condensés.

La courbe d'élution du vin jeune est formée de 4 pics en plus du précédent et celle du vin vieux ne présente plus que 2 pics correspondant à des substances autres que les tanins condensés. Le vin très vieux a par contre tout perdu excepté les tanins condensés (fig. 3).

Dans le cas du vin jeune, les bandes correspondant aux différents pics possèdent certaines caractéristiques :

— Pic n° I, marron, rouge foncé ;

— Pic n° II, éloigné du précédent, assez diffus et étalé ; sa couleur, plus rougeâtre, est faible par rapport aux autres ;

— Pic n° III, intensément rouge, proche du second ;

— Pics n° IV et n° V, peu importants, rouge sombre.

Il est à remarquer que les courbes de la figure 3 ne sont pas des cas particuliers. Tous les vins jeunes de la région bordelaise présentent la courbe (1) avec des pics plus ou moins importants suivant les cas. Tous les vins vieux ont sensiblement la courbe (2) avec disparition progressive des pics II et III en fonction de l'âge, jusqu'à atteindre la courbe (3) qui est caractéristique des vins très vieux. Ces résultats sont conformes à ceux de SOMERS (1966).

Nous nous sommes limités à l'identification des tanins, des anthocyanes et des acides-phénols. Les tanins et les anthocyanes ont été dosés dans chaque tube par les méthodes classiques, tandis que les acides-phénols ont été mis en évidence dans chaque fraction après hydrolyse alcaline et chromatographie sur papier dans le toluène-acétique. Ces derniers sortent surtout dans les trois premières fractions et en particulier dans la seconde.

La figure 4, obtenue à partir d'un vin jeune, montre les concentrations respectives de tanins et d'anthocyanes de chaque tube. Les tanins condensés se trouvent en I, avec des traînées en II, III et IV, pouvant correspondre à des molécules peu condensées. Les anthocyanes sont abondantes en III, mais possèdent en I, II et V des concentrations non négligeables.

Donc, en résumé :

— Fraction I : tanins, quelques anthocyanes et acides-phénols ;

— Fraction II : acides-phénols, tanins et anthocyanes en quantité assez importante ;

— Fraction III : anthocyanes, quelques tanins et acides-phénols ;

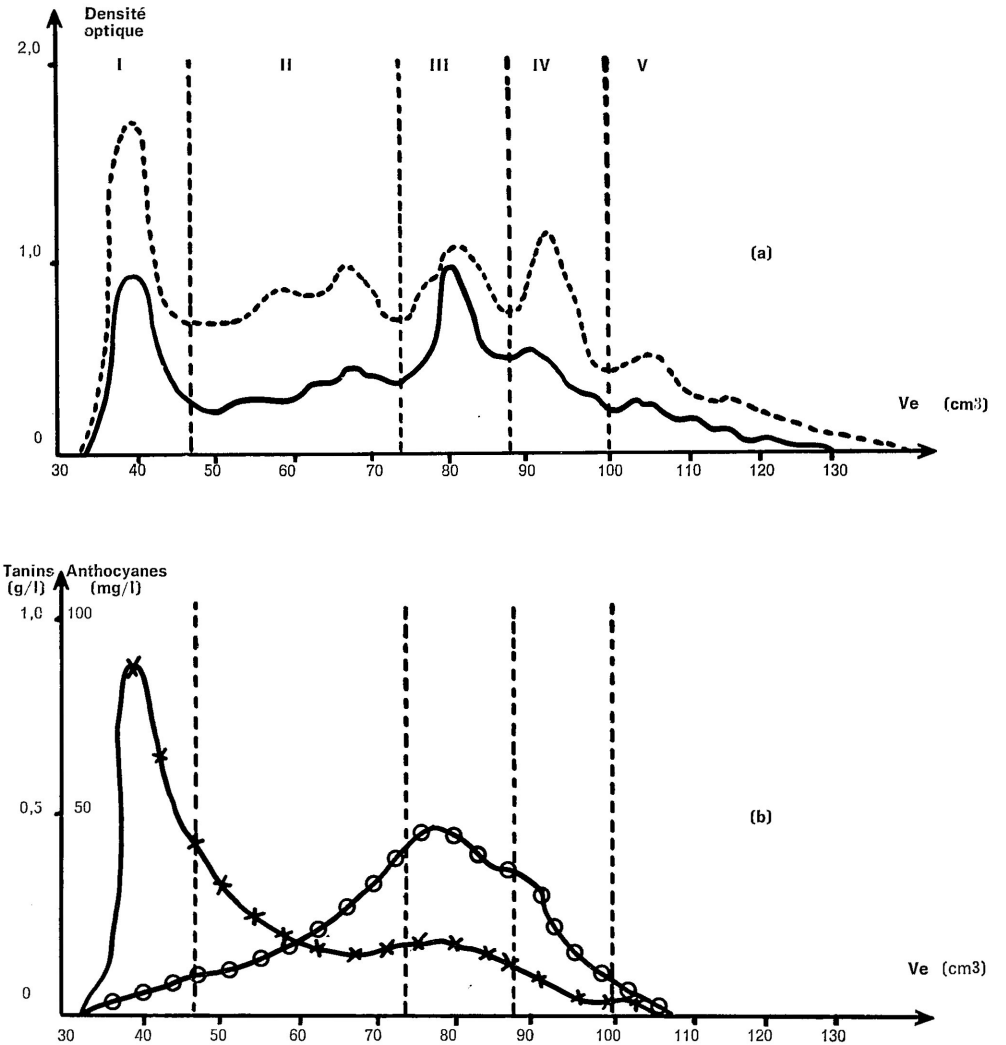


Fig. 4. — Comparaison entre différentes courbes d'élution des polyphénols du vin de 1968.
(a) Courbes d'élution des polyphénols (mesure des densités optiques)
———— Courbe à 540 nm — — — — — Courbe à 280 nm
(b) Courbes d'élution des tanins et des anthocyanes -x-x-x- tanins -o-o-o-o- Anthocyanes

— Fractions IV et V : rien n'a été identifié avec précision, excepté quelques tanins et anthocyanes.

Dans le cas des vins d'âges différents, on conclut à la disparition au cours du vieillissement de la fraction « anthocyanes » ; seule demeure la fraction « tanins condensés ».

Cette méthode permet donc la séparation des deux principaux groupes de phénols des vins rouges (tanins et anthocyanes). Elle a été surtout utilisée afin d'obtenir une certaine quantité de tanins (fraction I) de chaque type de vin, pour une analyse ultérieure plus détaillée. Dans ce but, nous avons utilisé une grosse colonne de fort débit permettant de travailler sur des quantités plus importantes de vin.

3° **Fractionnement des flavolanes constitutives des tanins condensés.**

L'intérêt de pouvoir fractionner les oligomères (flavolanes) intervenant dans la composition des tanins condensés précédemment isolés est évident. On peut espérer ainsi accéder à certaines caractéristiques chimiques des tanins des vins rouges, en relation avec leur couleur et leurs propriétés organoleptiques. Nous avons fait appel dans ce but, à certaines catégories de Sephadex dans différentes conditions.

Sachant que les molécules de tanins (fraction I) ne sont pas fractionnées par le gel G 25 au cours des précédentes manipulations, on peut penser que cette catégorie de Sephadex n'est pas adaptée à notre étude. Nous avons essayé successivement d'autres catégories G 50, G 75, G 100, qui ont des coefficients de gonflement croissant avec un solvant donné ; ils sont susceptibles de posséder des pores plus gros, donc de laisser pénétrer de plus grosses molécules.

La figure 5 montre les courbes obtenues avec ces gels et un mélange eau - acétone - acide chlorhydrique comme solvant et éluant. L'extrait analysé provient de la bande (I) des tanins condensés du vin vieux de la première expérience (fig. 3) ce vin possède probablement une plus grande quantité de formes condensées que le vin jeune.

Nous constatons dans tous les cas, que les tanins ne sont pas fractionnés par le gel ; cependant nous observons en fonction du gonflement des gels un déplacement du maximum et un étalement du pic. Ceci semble signifier que les tanins sont maintenant analysés par ces gels et que les courbes obtenues sont les enveloppes des différents polymères que l'on se proposait de séparer. L'utilisation de colonnes plus longues

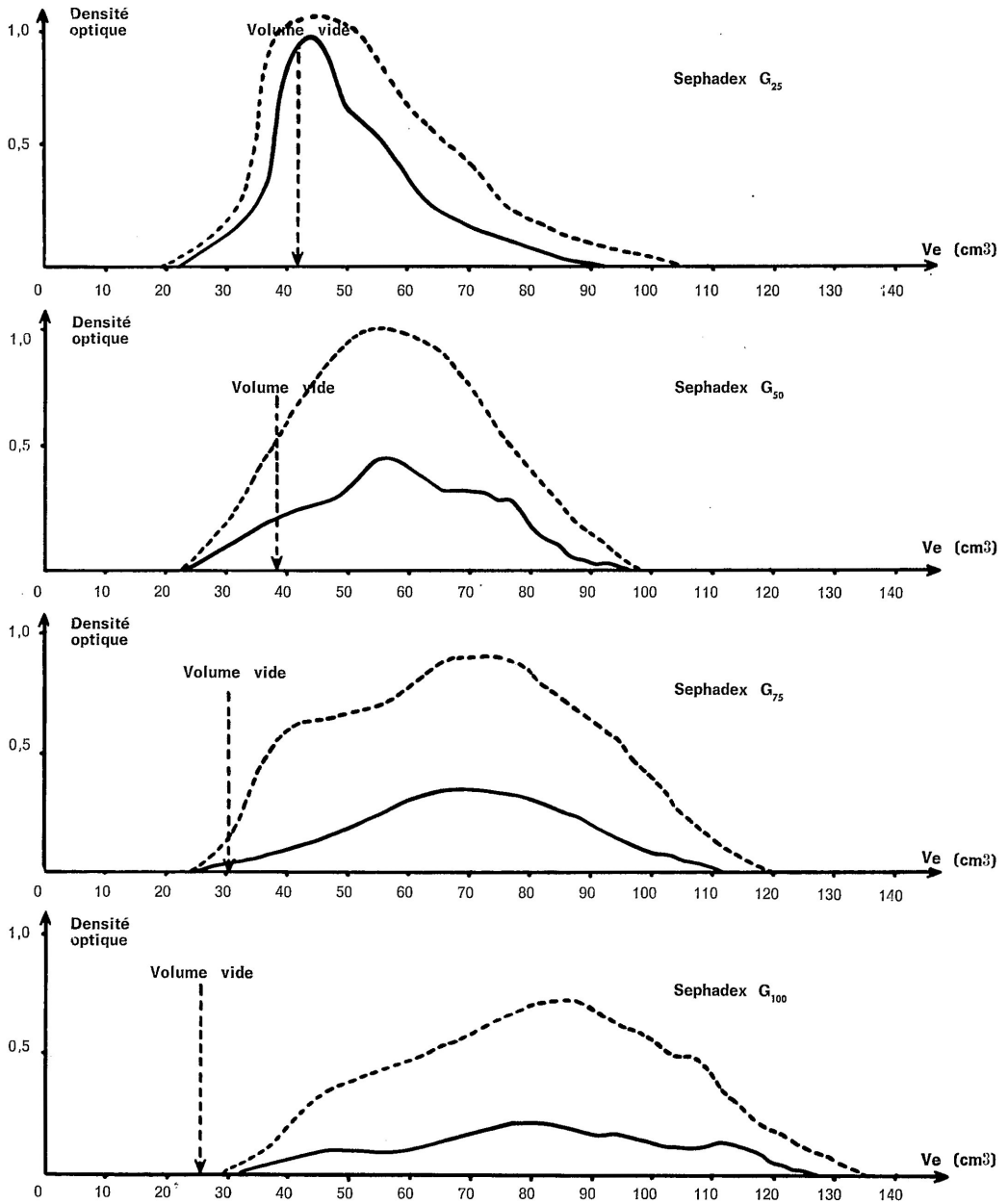


Fig. 5. — Chromatographie sur différents gels des tanins du vin de 1952 ; Eluant : H_2O, acétone, HCl.
Colonne : 1,5 x 50 cm
———— Courbe à 540 nm — — — — Courbe à 280 nm

et d'autres solvants ne paraît pas donner de meilleures séparations qui restent cependant insuffisantes.

III. - **Détermination de la masse moléculaire moyenne.**

1° **Microcryométrie.**

La méthode qui nous a donné les meilleurs résultats pour la détermination de la masse moléculaire moyenne du tanin est dérivée des lois de RAOULT et plus particulièrement de la cryométrie. Elle consiste à mesurer l'abaissement du point de fusion d'un solvant après dissolution à chaud du composé de masse moléculaire inconnue (JEAN, 1961).

L'étude générale de la cryométrie montre que la nature du solvant joue un rôle important ; il ne doit pas être ionisant vis-à-vis de la substance étudiée et il doit avoir une constante cryométrique suffisamment importante pour produire un abaissement appréciable du point de fusion, même quand la masse moléculaire à déterminer est élevée. La méthode de Rast utilisant le camphre, comme solvant est bien adaptée à ce problème. La quantité de substance de masse moléculaire inconnue, mise en œuvre, est très faible (quelques milligrammes).

La détermination de l'abaissement cryométrique permettant de calculer la masse moléculaire du soluté peut se faire de deux façons différentes :

— Soit par la mesure des températures de congélation commençante du solvant et de la solution ;

— Soit par la mesure des températures de fusion finissante du solvant et de la solution.

La première méthode est surtout utilisée dans la cryométrie courante et la seconde dans le cas de la microcryométrie et en particulier dans la méthode de Rast.

Le point de fusion du camphre est comparé à celui du mélange camphre-substance inconnue ; la masse moléculaire de cette dernière est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta T = \frac{1\,000\ K}{M_B} \frac{X}{Y}$$

où

ΔT est l'abaissement cryométrique.

M_B est la masse moléculaire du soluté.

X est la masse de soluté.

Y est la masse de solvant (camphre).

K est la constante d'abaissement moléculaire du solvant ; elle est donnée dans la littérature et vérifiée expérimentalement, en mesurant l'abaissement cryométrique de substances dont la masse moléculaire est parfaitement connue (Tableau II) (pour le camphre K $\sim$ 40).

TABLEAU I

Exemple de détermination de la masse moléculaire du tanin d'un vin de 1966 (les deux extraits ont été réalisés séparément à partir du même vin).

* **Indice de température indiqué par le thermomètre de Roberteau.**

** **(Δ T) exprimé en degrés Celsius.**

			Température de fusion *	Abaissement cryométrique ** (ΔT)	Masse moléculaire calculée	
	Camphre		6,4			
1re extraction	1er mélange c = 0,1004	1re mesure	4,3	2,1	1912	2008 ± 200
		2me mesure	4,4	2	2008	
		3me mesure	4,4	2	2008	
	2me mélange c = 0,0886	1re mesure	4,8	1,6	2215	
		2me mesure	4,7	1,7	2084	
		3me mesure	4,85	1,55	2286	
	Camphre		6,7			
2me extraction	1er mélange c = 0,1035	1re mesure	5	1,7	2435	2183 ± 273
		2me mesure	4,8	1,9	2178	
	2me mélange c = 0,1310	1re mesure	4	2,7	1940	
		2me mesure	4,3	2,4	2183	
		3me mesure	4,2	2,5	2096	

TABLEAU II

Comparaison des masses moléculaires mesurées et théoriques de deux échantillons.

	Concentration du mélange	(ΔT)	Masse moléculaire		Constante Cryométrique	
			mesurée	théorique Mth	$K = \frac{\text{calculée } (\Delta T)\ Mth}{C}$	théorique utilisée
Leucocyanidine	0,138	10 ± 0,6	552 ± 33	594	43	40
Quercétine	0,118	14 ± 1	337 ± 24	302	39	40

Le camphre ou le mélange, dont on veut déterminer le point de fusion, sont placés dans un capillaire, lui-même accroché au réservoir d'un thermomètre immergé dans un bain chauffé. Les mesures de température sont faites avec le thermomètre de Roberteau qui apporte une grande précision à la lecture.

Les facteurs pouvant agir sur la reproductibilité des mesures sont sous la dépendance des conditions du mélange et de la détermination du point de fusion. La concentration en soluté du mélange doit être de l'ordre du dixième ; les capillaires doivent être tous de la même forme, avoir les mêmes dimensions, leur position par rapport au thermomètre et dans le bain être établie une fois pour toutes ; le chauffage du bain doit être effectué de façon identique avec la même intensité et à partir de la même température.

Pour éviter les erreurs de manipulation nous avons fait pour chaque détermination deux mélanges « camphre-substance » et pour chacun d'eux plusieurs déterminations du point de fusion (tableau I) ; dans certains cas, deux extractions séparées à partir du même vin ont été réalisées.

La précision avec laquelle les masses moléculaires sont déterminées est fonction de l'erreur absolue commise sur la température (les autres étant négligeables devant cette dernière). Elle est donnée par la formule suivante :

$$\frac{\Delta M}{M} \simeq \frac{0{,}2}{T_0 - T_1}$$

où T_0 est le point de fusion du camphre.

T_1 est le point de fusion du mélange.

0,2 représente l'erreur absolue sur les lectures de la température.

Dans le cas des vins, elle est comprise entre 3 p. cent (masse moléculaire faible) et 20 p. cent (masse moléculaire élevée).

La validité de la méthode a été mise en évidence par les essais réalisés avec la quercétine du commerce et la leucocyanidine extraite du pin maritime par MASQUELIER (Université de Bordeaux II). (Tableau II).

La fraction tanin isolée par filtration sur gel Sephadex est, en fait, un mélange de molécules plus ou moins condensées : la masse moléculaire mesurée ne représente qu'une valeur moyenne de celles des différents polymères. Ceci peut se traduire par :

$$M = \frac{x_1 M_1 + x_2 M_2 + \ldots\ldots + x_n \quad M_n}{x_1 + x_2 + \ldots\ldots + x_n \quad = 1}$$

où (M est la masse moléculaire trouvée

(M_1 est la masse moléculaire de chaque polymère

(n est l'indice de polymérisation

($x_1 \ldots\ldots x_n$ est la fraction moléculaire de chaque polymère

Bien que ne donnant pas de renseignements précis sur les différentes formes de tanins condensés, cette masse moléculaire moyenne est quand même fonction de la quantité de polymères ; si elle est élevée, il est logique de penser que les oligomères sont plus condensés et inversement.

L'étude réalisée sur des vins d'âges différents issus du même vignoble de la région bordelaise (tableau III a) ainsi que sur des vins de Bourgogne (tableau III b), montre une augmentation de la masse moléculaire moyenne des tanins au cours du vieillissement ; la théorie de la condensation de ces molécules en fonction du temps (RIBEREAU-GAYON, 1968 et 1973) est ici vérifiée. De plus elle est comprise entre 800 et 4 000, ce qui correspond approximativement à une répartition allant du dimère à un peu plus du décamère. La dernière colonne du tableau montre les limites de la polymérisation des tanins du vin en prenant comme base une molécule de leucocyanidine de masse moléculaire égale à 306.

TABLEAU III

Masses moléculaires moyennes des tanins de différents vins.

a - **Vins issus du même vignoble de la région bordelaise ;**
b - **Vins de Bourgogne ;** c - **Vins issus de vinifications différentes.**

	Années	Tanins totaux (g par l)	Anthocyanes (mg par l)	D.O. 280 x 100	F.C.	V / LA	Masse moléculaire moyenne	Nombre de molécules élémentaires de flavanes
a	1962	2,8	30	35	37	1,16	2902 ± 412	8 — 10
	1964	5,5	38	53	59	0,90	1923 ± 183	5 — 6
	1966	3,5	58	41	45	1,06	2008 ± 200	5 — 7
	1969	3,3	90	40	50	1,62	1876 ± 124	5 — 6
	1970	2,9	200	39	42	1,30	1053 ± 78	3 — 4
b	S. B. 1967	2,6	36	36	32	1,52	2630 ± 137	8 — 9
	M. S. D. 1968	2,2	54	37	31	1,65	2189 ± 144	6 — 7
	B. V. 1970	1,8	164	38	32	1,72	1865 ± 168	5 — 6
	B. 1970	0,9	138	29	22	1,14	1701 ± 199	4 — 6
c	Témoin 1966	4,5	90	57	57	1,30	2183 ± 273	6 — 8
	Chauffage + vinification en blanc 1966	3,1	104	44	44	1,00	1641 ± 108	5 — 6
	Chauffage + vinification en rouge 1966	4,5	120	55	58	1,10	2370 ± 296	6 — 8
	Témoin 1971	2,5	416	44	42	1,90	1716 ± 326	4 — 6
	Chauffage + vinification en blanc 1971	3,6	492	57	55	1,80	1334 ± 85	4 — 5

Cependant, la structure des tanins, tout en étant fonction de l'âge, dépend aussi de la nature du vin, des conditions du millésime et du type de vinification (tableau III c).

2° **Utilisation du Sephadex pour la détermination des masses moléculaires.**

Une autre méthode pour la détermination de la masse moléculaire est basée sur l'utilisation du Sephadex.

De nombreux travaux sur les protéines montrent qu'il peut exister une relation entre la masse moléculaire et le volume d'élution dans la mesure où le gel sépare les substances à analyser.

Nous avons recherché une telle relation dans le cas de la filtration sur gel des tanins du vin, sachant qu'ils passent dans le volume vide du Sephadex G 25 et qu'ils ont leur chemin retardé dans les catégories qui gonflent plus, Sephadex G 50, G 75, G 100 (fig. 5).

FLODIN (1962) a montré que le volume d'élution (Ve) d'une substance est une fonction sensiblement linéaire du logarithme de sa masse moléculaire. En première approximation nous pouvons écrire que :

$$Ve = a \log M + b \quad (1).$$

Si les molécules de tanins suivent cette relation nous pourrons tracer une courbe d'étalonnage en utilisant des substances de référence ; cette courbe dépendra de la catégorie du gel, des dimensions de la colonne et du type de molécule étudiée.

Cependant, le passage à travers le gel de nombreux échantillons provoque un tassement entraînant une diminution assez sensible des différentes valeurs précédemment définies (Ve, Vt, Vo). LAURENT et KILLANDER (1964) ont fait intervenir dans la relation (1) une expression Kav indépendante de la géométrie et de la compacité du gel. Kav peut être calculé par la formule suivante :

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo} = \frac{Ve - Vo}{Vs}$$

où

Vs est le volume occupé par les perles de gel gonflées de solvant.
Ve est le volume d'élution.
Vo est le volume vide du gel.
Vt est le volume total du gel.

En remplaçant Ve par sa valeur en fonction de Kav, la relation (1) devient :

$$Kav = \frac{a}{Vs} \log M + \frac{b}{Vs} - \frac{Vo}{Vs}$$

Nous constatons que Kav est également une fonction linéaire de log M. Nous pourrons donc tracer une courbe étalon en calculant pour chaque substance de la gamme la valeur Kav en fonction de son volume d'élution et des caractéristiques du gel. Cette courbe sera caractéristique d'un mode opératoire donné et indépendante du tassement du gel.

Si le gel fonctionne parfaitement comme un tamis moléculaire, cette méthode donne une estimation grossière de la masse moléculaire des substances étudiées. Dans le cas du vin, le tamisage ne se fait pas de façon idéale en raison de l'adsorption ; mais on peut admettre que ce phénomène parasite est constant pour un type de molécule.

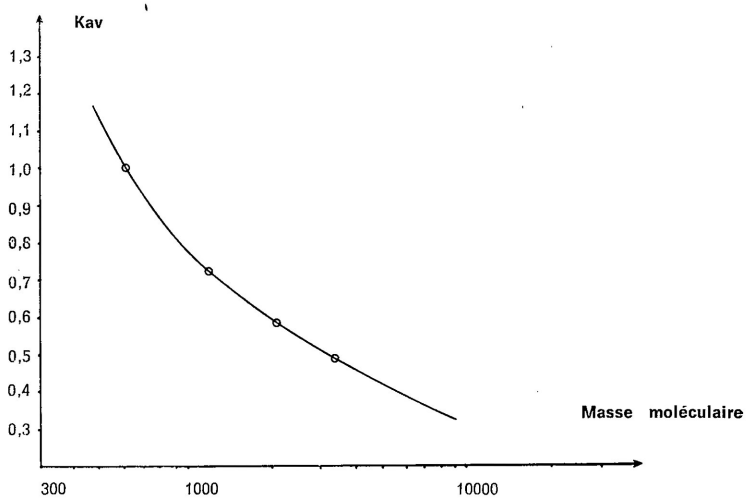


Fig. 6. — Courbe d'étalonnage des tanins du vin (Séphadex G75).

Pour faire une courbe étalon correcte des tanins du vin, il faudrait avoir toute une gamme de polymères de flavanes à l'état pur, ce qui n'existe pas actuellement. Nous avons tourné cette difficulté en utilisant des flavolanes de vin de masse moléculaire moyenne déterminée par la méthode cryométrique précédente. Ce sont des dimères de leucoanthocyanes et des tanins condensés de masse moléculaire respective de 1 200, 2 100 et 3 400.

Ces substances ont été passées sur une colonne (1,5 × 50 cm) remplie de gel permettant l'analyse (Sephadex G 75). Leurs volumes d'élution, supérieurs au volume vide du gel, ont servi au calcul des coefficients Kav utilisés pour tracer la courbe étalon (fig. 6).

Sur la même colonne, nous avons passé les tanins condensés de trois vins d'âges différents (1952, 1966, 1968) préalablement séparés sur Sephadex G 25 fin. La correspondance sur la courbe des coefficients Kav calculés comme précédemment donne une valeur approchée de leur masse moléculaire (tableau IV).

Ces valeurs sont forcément approximatives comme la courbe d'étalonnage elle-même. Si on compare ces données à celles fournies par la méthode de Rast à partir des mêmes vins (tableau IV) nous constatons que dans les deux cas il y a augmentation de la masse moléculaire au cours du vieillissement avec cependant des valeurs plus fortes par la méthode de Rast ; les résultats sont comparables seulement pour le vin de 1968.

Tableau IV

Masses moléculaires des tanins de différents vins déterminées par filtration sur gel (1) et par la méthode cryométrique de Rast (2).

Vins	Volume d'élution (cm^3)	Kav	Masse moléculaire (1)	Mase moléculaire (2)
1952	68	0,60	2000	3750
1966	75	0,70	1300	2134
1968	80	0,78	1000	1071

Cette méthode permet donc de donner une idée très grossière des masses moléculaires, à la condition toutefois de pouvoir tracer la courbe d'étalonnage.

IV. - **Ultrafiltration.**

L'ultrafiltration permet un fractionnement de substances en fonction de la dimension des molécules. Elle se divise en deux catégories :

— Filtration par tamisage avec membranes microporeuses ;

— Filtration par diffusion moléculaire avec membranes semi-perméables.

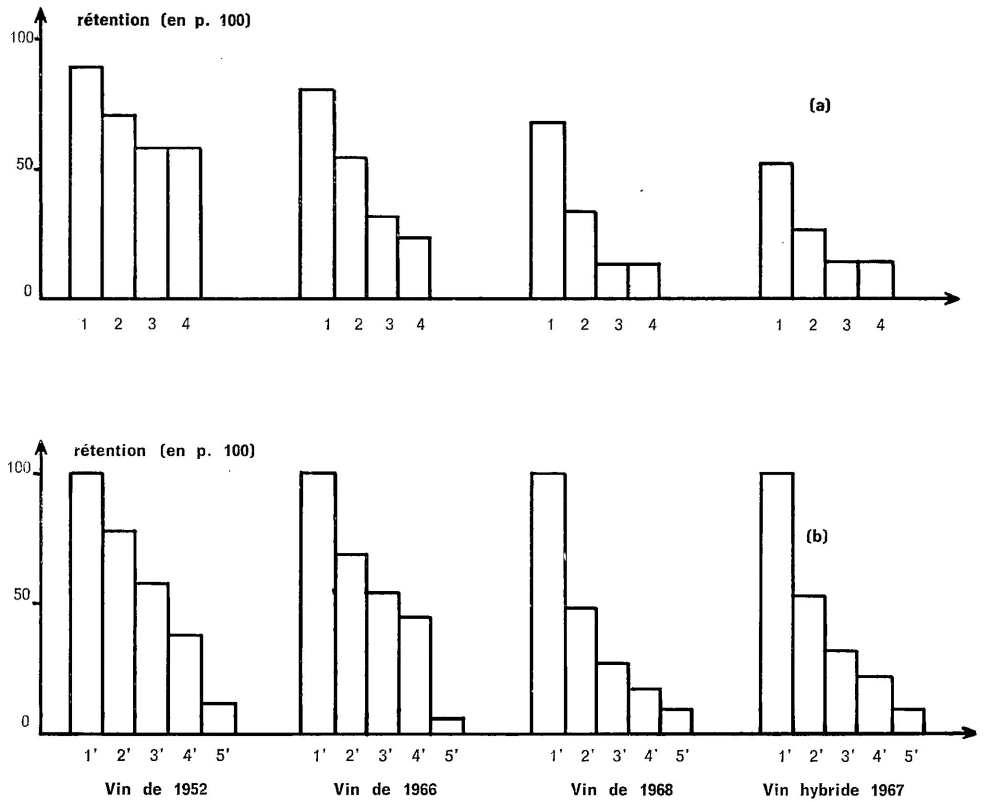


Fig. 7. — Pourcentage de retention des tanins totaux de différents vins avec :
(a) les membranes microporeuses
(1) Lsg60 (∅ = 0,005 μ); (2) Vs (∅ = 0,025 μ); (3) Vm (∅ = 0.050 μ); (4) Vc (∅ = 0,1 μ)
(b) les membranes semi-perméables
(1') Pellicon (PM = 1000); (2') PM_{10} (PM = 10000); (3') PM_{30} (PM = 30000);
(4') XM_{50} (PM = 50000); (5') XM_{100} (PM = 100000).

Les filtres correspondant à la première catégorie sont comparables à des tamis dont les pores sont calibrés sur toute l'épaisseur. Les molécules d'encombrement supérieur au diamètre des pores ne passent pas et tendent à se fixer sur la surface.

Les filtres fonctionnant par diffusion moléculaire sélectionnent les molécules suivant un principe différent. Certaines molécules d'un liquide sous pression peuvent s'échapper par un pore tellement petit que le débit n'affecte nullement la répartition des vitesses de celles qui restent dans le récipient ; en somme, il n'y a aucun courant d'ensemble appréciable en direction de l'orifice. Une agitation permanente du liquide est nécessaire pour satisfaire ces conditions.

Deux phénomènes viennent se superposer à l'ultrafiltration des vins : l'adsorption des polyphénols et le colmatage des pores. L'adsorption est due à la présence, sur la surface de la membrane, suivant la nature du réseau qui la constitue, de sites ioniques en nombre plus ou moins grand, qui sont susceptibles de former des liaisons avec les molécules de polyphénols du vin ; le colmatage est surtout important dans le cas des filtres microporeux. L'agitation du liquide à filtrer, en empêchant la formation de dépôt, permet de diminuer l'adsorption et le colmatage.

D'après nos résultats, l'ultrafiltration sur membranes microporeuses et sur membranes semi-perméables ne donne pas de renseignements intéressants, ni sur la taille, ni sur la masse moléculaire des substances retenues, probablement à cause du rôle prépondérant joué par les phénomènes parasites. Sur membranes semi-perméables, tous les vins se comportent de façon pratiquement identique (fig. 7 a) ; c'est-à-dire que la rétention des tanins sur une membrane donnée est sensiblement la même quelque soit le vin. Par contre, la filtration par tamisage semble susceptible de résultats intéressants ; en effet, cette technique, appliquée aux vins (fig. 7 a), montre une rétention plus grande des tanins du vin vieux, ce qui confirme une augmentation de la condensation au cours du vieillissement. On constate, d'autre part, que cette augmentation est particulièrement rapide lors des premières années de la conservation.

On confirme aussi que les tanins condensés sont responsables de la presque totalité de la couleur des vins vieux et contribuent moins à celle des vins jeunes (fig. 8). En effet, le pourcentage de substances responsables de la couleur du vin vieux arrêtées par la membre Vc (membrane aux pores les plus larges 0,1 µ, est très élevé ; la même membrane arrête peu ces substances dans le cas du vin jeune.

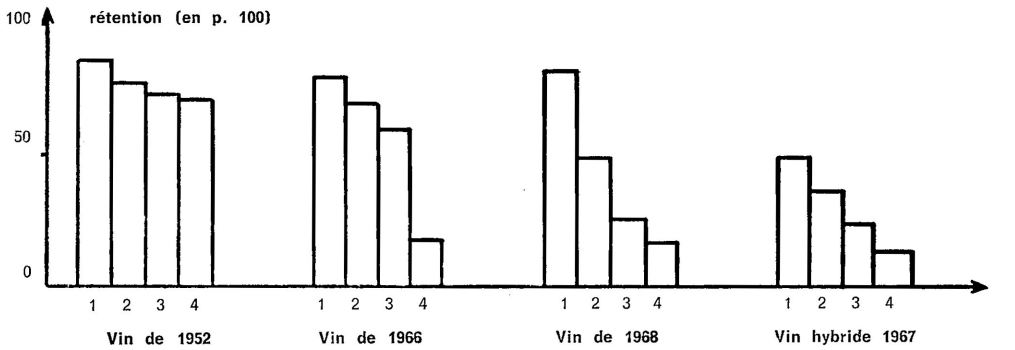


Fig. 8. — Pourcentage de rétention des substances responsables de la couleur du vin sur les membranes microporeuses (mesure de l'intensité colorante $d_{420} + d_{520}$ nm)

V. - **Conclusion.**

La technique de filtration sur gel Sephadex présente donc deux applications intéressantes. Elle permet de séparer les tanins des anthocyanes et donne un ordre de grandeur de leurs masses moléculaires, mais elle paraît insuffisante pour le fractionnement des oligomères constitutifs des tanins.

La masse moléculaire moyenne des tanins des vins rouges, isolés avec la technique précédente, est déterminée à l'aide d'une méthode microcryométrique utilisant le camphre comme solvant. Les valeurs trouvées sont de l'ordre de 1 000 pour le vin jeune et de 3 000 pour le vin vieux.

L'ultrafiltration appliquée aux vins montre une rétention plus grande des tanins des vins vieux, ce qui confirme une augmentation de la condensation au cours du vieillissement. Elle met en évidence l'importance de la contribution des tanins à la couleur du vin rouge.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 — **Dosage des composés phénoliques.**

Au cours de cette étude il a été nécessaire de déterminer les caractéristiques chromatiques du vin (SUDRAUD 1963) et de doser les différents groupes de phénols :

— les tanins sont dosés par transformation des leucoanthocyanes en anthocyanes par hydrolyse acide (RIBEREAU-GAYON et STONESTREET, 1966).

— les anthocyanes sont dosés par la méthode utilisant la différence de pH (RIBEREAU-GAYON et STONESTREET, 1965).

— les composés phénoliques totaux sont dosés par la mesure de l'absorbance à 280 nm et au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu, (RIBEREAU-GAYON, 1970).

2 — **Extraction des composés phénoliques du vin.**

a) 10 à 20 cm^3 de vin sont traités par 1 à 2 cm^3 d'acétate basique de plomb puis centrifugés ; la quantité de réactif à utiliser est telle que le vin doit être totalement décoloré. Après centrifugation le précipité est lavé et mis en suspension dans un mélange hydroalcoolique (50,50) ; les polyphénols sont déplacés du complexe plomb-polyphénols par 0,5 à 1 cm^3 d'HCl concentré et la liqueur obtenue est concentrée sous vide jusqu'à 1 cm^3.

b) 5 à 20 cm^3 de vin sont évaporés presque jusqu'à sec dans un évaporateur rotatif et repris par 50 cm^3 de méthanol chlorhydrique (0,1 p. 100 HCl). Cette solution est filtrée et évaporée à sec. Le résidu est dissous dans le solvant Eau - Acétone - Acide chlorhydrique (50, 50, 0,1) ou Eau - Ethanol - Acide chlorhydrique (60, 40, 0,1).

c) Pour la démixtion, 1 à 2 cm^3 d'éthanol, 24 g de NaH_2PO_4 et 40 g de $MgSO_4$, sont ajoutés à 35 cm^3 de vin dans une fiole jaugée de 50 cm^3 placée dans bain thermostaté à 35 °C et agités avec un agitateur magnétique ; au bout de quelques minutes la phase organique contenant les composés phénoliques se sépare à la partie supérieure de la phase aqueuse.

3 — **Séparation des différents composés phénoliques.**

Le gel Sephadex G 25 fin est gonflé avec un mélange Eau-Ethanol-Acide chlorhydrique (60, 40, 0,1) pendant une nuit. La dimension de la colonne utilisée pour les séparations fines est de 1,5 x 50 cm (volume d'échantillon 1 cm^3) et celle utilisée pour les séparations préparatives de 2,5 x 50 cm (volume d'échantillon 2 cm^3). La fraction tanin est récupérée dans un collecteur de fractions, puis séchée sous vide. Elle se présente sous forme de poudre dont la couleur varie du jaune au brun foncé.

4 — **Mesure de la masse moléculaire moyenne des tanins.**

Le matériel utilisé comprend un thermomètre de Roberteau et un matras à long col rempli d'un liquide stable jusqu'à 200° C (paraffine) chauffé à feu doux par un bec Bunsen ; 10 à 20 mg de la fraction tanin sont mélangés intimement dans un petit tube à essais avec 10 fois plus de camphre pur fraîchement sublimé, puis le tube est placé dans un bain préalablement chauffé à 180° C. Dès que le camphre fond, le liquide est remué et le tube rapidement sorti du bain. Le refroidissement s'effectue dans le même tube et le mélange est alors pulvérisé finement. Une petite quantité de la poudre est tassée à l'extrémité fermée du capillaire. Ce dernier est accroché à la partie inférieure du thermomètre de Roberteau ; l'ensemble thermomètre-capillaire est placé dans un bain et chauffé jusqu'à fusion. La température à laquelle le dernier fragment de solide disparaît donne le point de fusion.

La même opération est réalisée avec le camphre pur.

5 — **Ultra-filtration.**

Chaque type de membrane se présente sous un aspect différent. Certaines sont employées à l'état sec et possèdent deux faces de nature différente : la face brillante est généralement placée à la partie supérieure (Pellicon, VC, VM, VS).

Les membranes Lsg 60 (livrées en emballage humide) ainsi que celles des séries PM et XM doivent être rincées à l'eau distillée avant d'être utilisées.

La cellule filtrante comporte une agitation et un volume utilisable de 10 cm^3 ; la pression sur le vin est de l'ordre de 4 à 5 bars pour les membranes poreuses et de 1 à 2 bars pour les membranes semi-perméables.

Manuscrit reçu le 9 février 1973.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERTRAND A., 1971. — Utilisation de la démixtion pour le dosage de quelques substances volatiles du vin par chromatographie en phase gazeuse, **Chim. Anal.**, 9, 577.

DREWES S.E. et ILSLEY A.H., 1969. — Dioxan-linked biflavanoid from the heartwood of **Acacia mearnsii, J. Chim. Soc.** (C) G.B., 6, 897.

DUBOIS P., 1969. — Extraction des composés volatils en solutions hydro-alcooliques par démixtion avec des sels, **Ann. Technol. Agric.** 18 (3), 241.

FLODIN P., 1962. — Dextran gels and their applications in gel filtration, **Pharmacia,** Uppsala (Suède).

GLORIES Y., 1971. — Essais de détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge. **Thèse doctorat 3ème cycle,** Bordeaux.

JEAN H., 1961. — Cryométrie, in **Microanalyse organique élémentaire. Détermination des masses moléculaires,** Masson Editeur, Paris.

JURD L., 1969. — Review of polyphénol condensation reactions and their possible occurence in the aging of wines, **Amer. J. Enol. Vitic.,** 20, (3), 191.

JURD L. et SOMERS T.C., 1970. — The formation of Xanthylium salts from proanthocyanidins, **Phytochem.,** 9, 419.

LAURENT T.C. et KILLANDER J., 1964. — A theory of gel filtration and its experimental verification, **J. Chrom.,** 14, 317.

RIBÉREAU-GAYON P., 1968. — **Les composés phénoliques des végétaux,** Dunod éditeur, Paris.

RIBÉREAU-GAYON P., 1970. — Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges, **Chim. Anal.,** 52, (6), 627.

RIBÉREAU-GAYON P., 1973. — Interprétation chimique de la couleur des vins rouges, **Vitis,** (à paraître).

RIBÉREAU-GAYON P. et GLORIES Y., 1971. — Détermination de l'état de condensation des tanins du vin rouge, **C.R. Acad. Sc. Paris,** (273), 2369.

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

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1966. — Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure, **Chim. Anal.,** 48, (4), 188.

ROLLMAN B., VANCRAENENBROECK R. et LONTIE R., 1966. — Identification d'un anthocyanogène du houblon, **Arch. Inter. physiologie. biochimie,** 74, 714.

SOMERS T.C., 1966. — Wine Tannins. — Isolation of condensed flavonoid pigments by gel-filtration, **Nature,** 209, 368.

SOMERS T.C., 1968. — Pigment profiles of grapes and of wines, **Vitis,** 7, 303.

SOMERS T.C., 1971. — The polymeric nature of wine pigments, **Phytochem.,** 10, 2175.

SUDRAUD P., 1963. — **Etude expérimentale de la vinification en rouge.** Thèse docteur-ingénieur, Bordeaux.

SWAIN T., 1962. — In **The Chemistry of flavoroïd compounds.** T.A. Geissman éditeur, Pergamon Press, Oxford.

SINGLETON V.L., 1961. — An extraction technique for recovery of flavors pigments and others constituents from wines and other aqueous solutions, **Amer. J. Enol. Vitic.,** 12, 1.