

Plan du cours

1- Introduction : le vin une matrice complexe

2- Méthodes d'extractions des composés d'arômes :

2.1- Principes généraux

2.2- Exemples de méthodes utilisées pour les composés volatils

2.2- Exemples de méthodes utilisés pour les précurseurs d'arômes

3- Méthodes d'analyse

3.1- Méthodes séparatives

3.2 - Méthodes globales

4- Identification et quantification des composés

4.1- Le détecteur par ionisation de flamme

4.2- La spectrométrie de masse

4.3- Les détecteurs spécifiques : exemple du PFPD et de l'AED

4.4- La dilution isotopique

L'arôme du vin : complexité d'origine

Arôme variétal

**Sol, Phytotechnie, Climat
Maturité**

Arôme pré-fermentaire

Opérations Pré-fermentaires

Arôme fermentaire

**Fermentations alcooliques
malo-lactiques**

Arôme de vieillissement

Élevage et vieillissement

Les composés d'arômes,

... des origines différentes

Composés variétaux libres ou liés :

- terpénols
- ionones et damascénone
- thiols , ...

Composés préfermentaires et fermentaires :

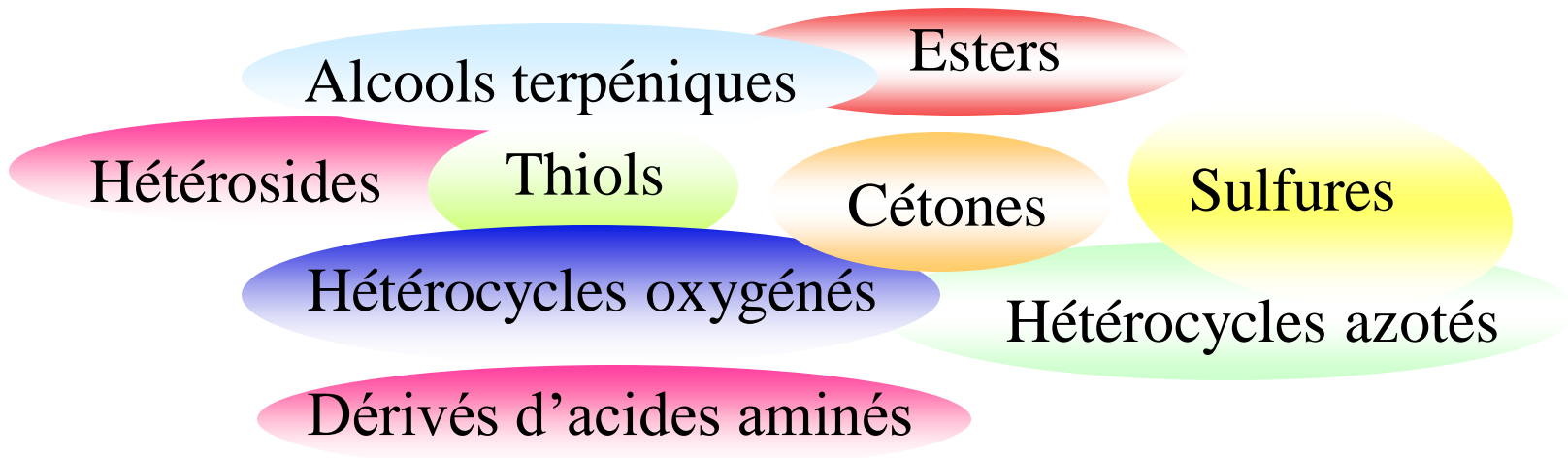
- composés en C6
- esters éthyliques d'acides gras
- acétates d'alcools supérieurs,...

Composés de vieillissement :

- DMS
- esters ramifiés,...

Les composés d'arômes et précurseurs,

... des structures chimiques variées



... des concentrations diverses

de la centaine de nanogramme/litre

à la dizaine de milligramme/litre

COMPLEXITE DE LA MATRICE VIN

Constituants du vin pour 1L

Eau 750-900 g
Ethanol 70-150 g
Sucres résiduels < 2 g
Polyols 4-12 g
Minéraux 0,7-1,6 g
Acides fixes 2,5-8 g
Polysaccharides 2-4 g
Cpsés azotés < 0,5 g
Polyphénols 0,1-7 g

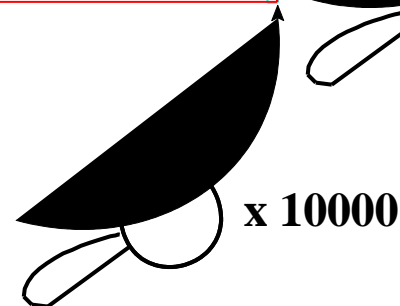
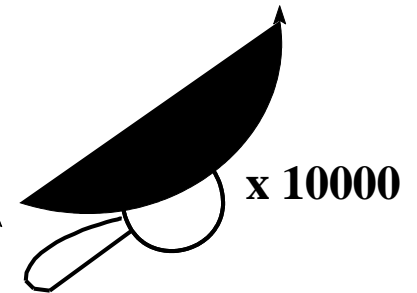
AcOH
AcOEt
AcH
IsoAmyl Alcool
100 mg/L

Cpsés
volatils
Total
1-2 g

Géraniol
Furanéol
Whisky lactone
Sotolon
Ethylphenol

β -damascenone
 β -ionone
Meo-iBuPyrazine
4MMP
3SHAc
Cpsés
volatils
10 ng/L

Cpsés
volatils
100 μ g/L



Processus analytique

1. Extraction

2. Analyse

3. Détection des composés

2. Méthodes d'extraction des composés d'Arôme

2.1- Principes généraux

2.2- Exemples de méthodes utilisées pour les composés volatils

2.3- Exemples de méthodes utilisés pour les précurseurs d'arômes

2.1 - Principes généraux

Extraction se base sur les propriétés particulières des composés cibles, et notamment sur les interactions qu'ils peuvent avoir avec matrice et les media d'extraction.

On met à profit la plus grande « affinité » de l'analyte avec les media d'extraction

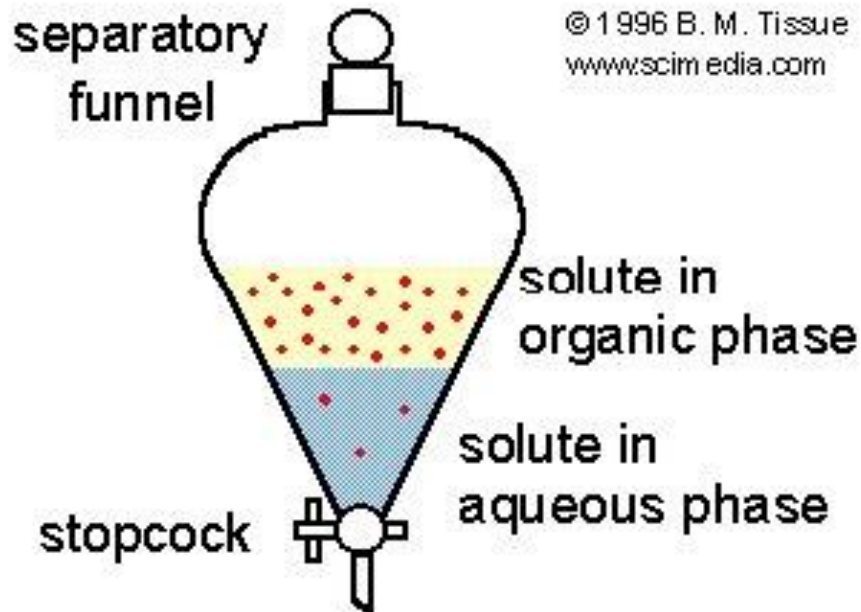
Principales interactions mises en jeu :

- liaisons Van der Waals
- volatilité
- liaison covalente
- échange d'ions
- affinité (anticorps)

2-2. Exemples de méthodes utilisées pour les composés volatils

- **extraction liquide/liquide par solvant**
- **extraction par SPME**
- **extraction par SBSE**
- **extraction par SPE**

Extraction par solvant en discontinu



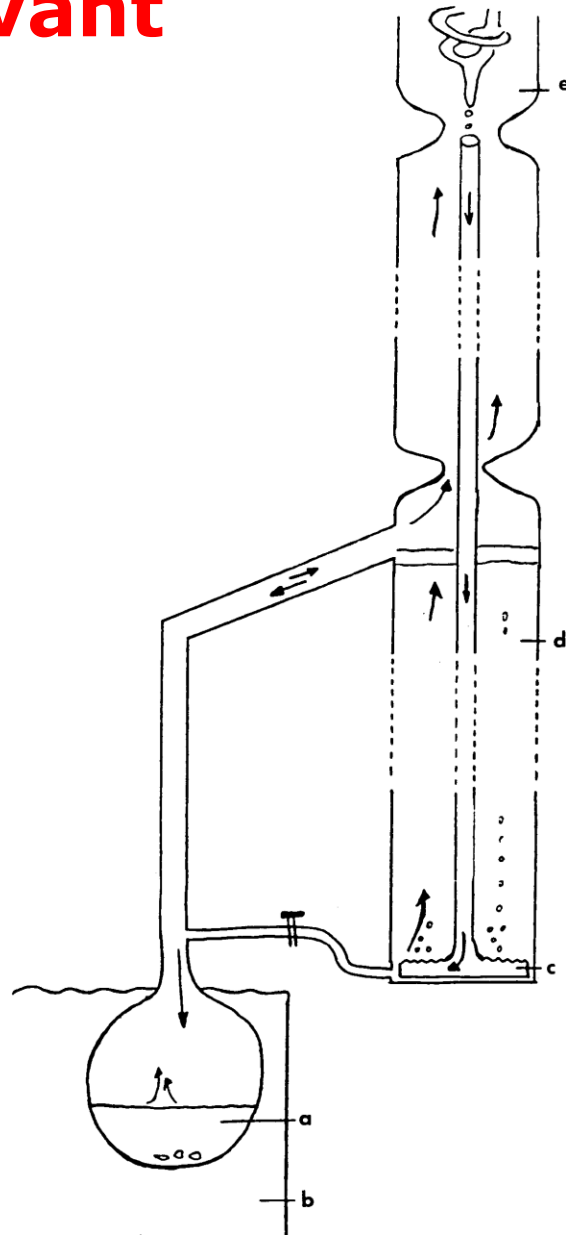
Principaux solvants utilisés

- pentane
- pentane/ CH_2Cl_2
- dichlorométhane
- éther éthylique

Limites :

- peu automatisable
- pb hygiène et sécurité
- concentration ultérieure
- couteuse

Extraction par solvant en continu



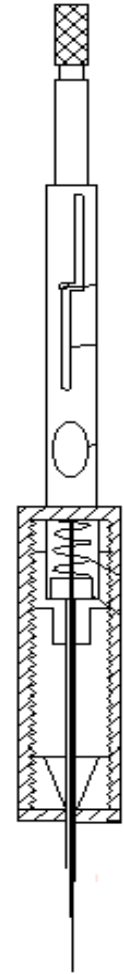
PRINCIPE DE LA SOLID PHASE MICRO EXTRACTION

Adsorption (#15 min) des composés sur une fibre de silice recouverte d'une phase absorbante ($\leq 1 \mu\text{L}$)

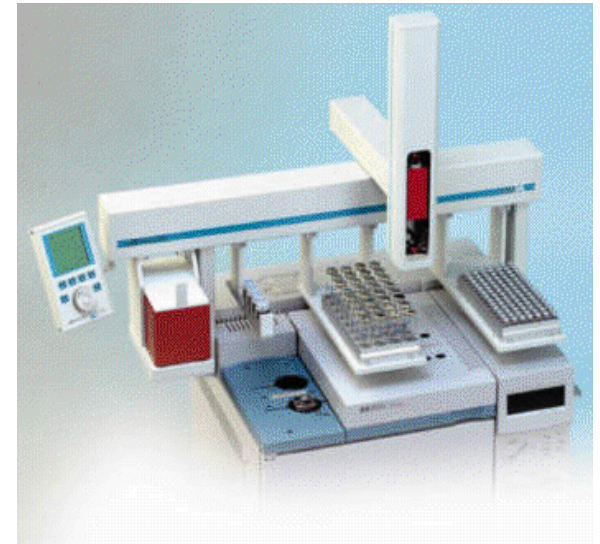
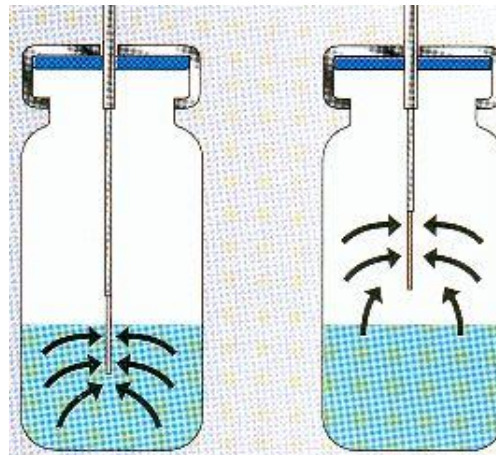
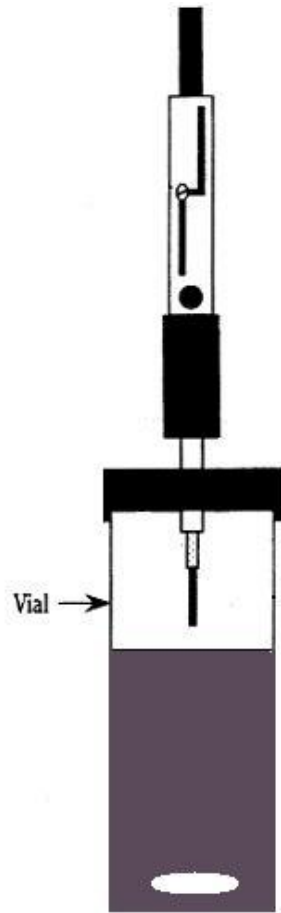
Désorption thermique (#2 min) dans l'injecteur d'un CPG

Opérations automatisables

Applications nombreuses: agro-alimentaire, parfums/cosmétiques, environnement, pharmacie



Extraction par SPME



- Adsorption de l'espace de tête de l'échantillon (préférentiel) ou de phase liquide
- Plusieurs types de phase adaptées aux composés volatils à piéger

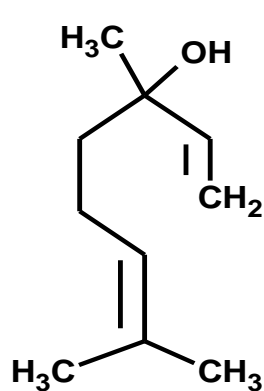
Table A. Fiber Selection Guide

Analyte Type (Molecular Weight)	Recommended Fiber
Gases and low molecular weight compounds (MW 30-225)	75 μm /85 μm Carboxen/ polydimethylsiloxane
Volatiles (MW 60-275)	100 μm polydimethylsiloxane
Volatiles, amines and nitro-aromatic compounds (MW 50-300)	65 μm polydimethylsiloxane/ divinylbenzene
Polar semi-volatiles (MW 80-300)	85 μm polyacrylate
Non-polar high molecular weight compounds (MW 125-600)	7 μm polydimethylsiloxane
Non-polar semi-volatiles (MW 80-500)	30 μm polydimethylsiloxane
Alcohols and polar compounds (MW 40-275)	65 μm /70 μm Carbowax/divinylbenzene
Flavor compounds: volatiles and semi-volatiles, C3-C20 (MW 40-275)	50/30 μm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane on a StableFlex fiber
Trace compound analysis (MW 40-275)	50/30 μm divinylbenzene/Carboxen on polydimethylsiloxane on a 2 cm StableFlex fiber
Amines and polar compounds (HPLC use only)	60 μm polydimethylsiloxane/ divinylbenzene
Surfactants and other polar analytes (HPLC use only)	50 μm Carbowax/templated resin

Applications HS - SPME

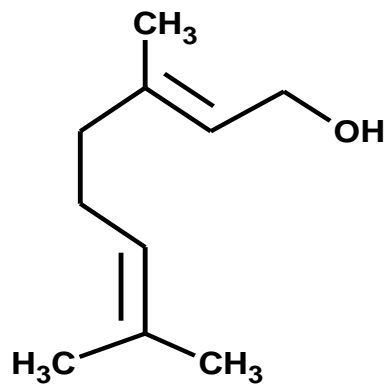
- Esters éthyliques et acétates
- Terpénols odorants sur Muscat
- Composés variétaux norisoprénoïdiques
- Sulfure de diméthyle et ses précurseurs
- Composés soufrés légers (éthanethiol, méthanethiol et leur disulfures)
- 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine
- Contaminants : géosmine, MIB, IPMP, haloanisoles phénols volatils

Terpénols odorants de baies de Muscat



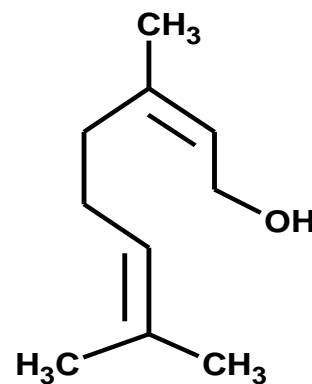
1

Linalol



2

Nérol



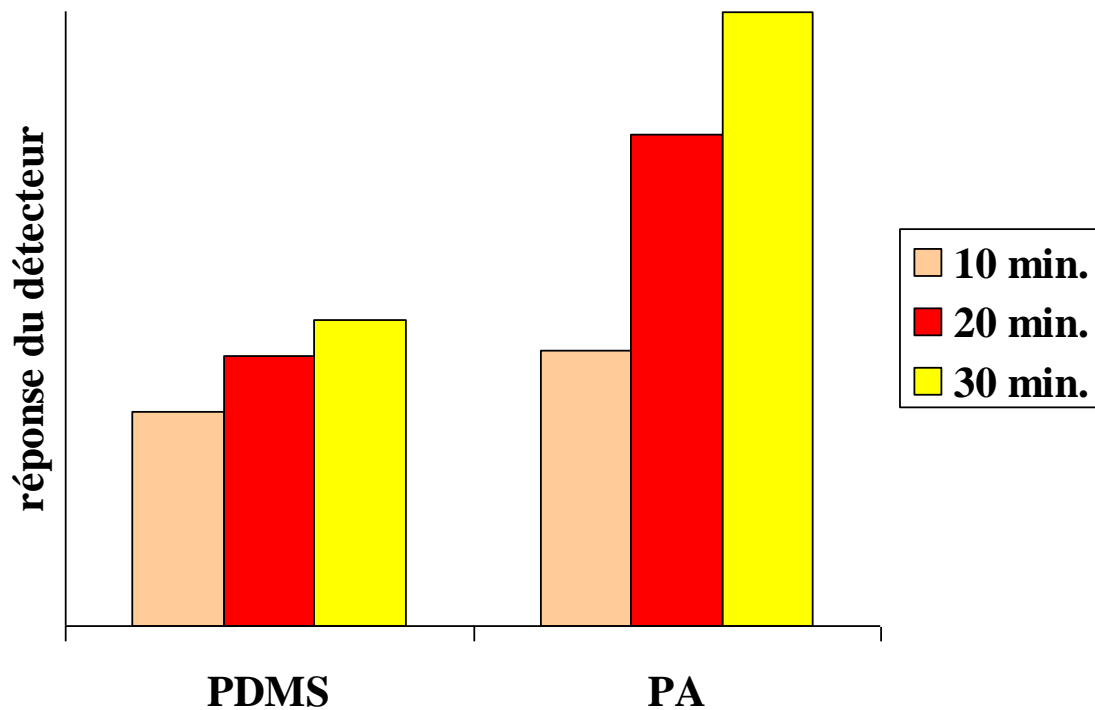
3

Géraniol

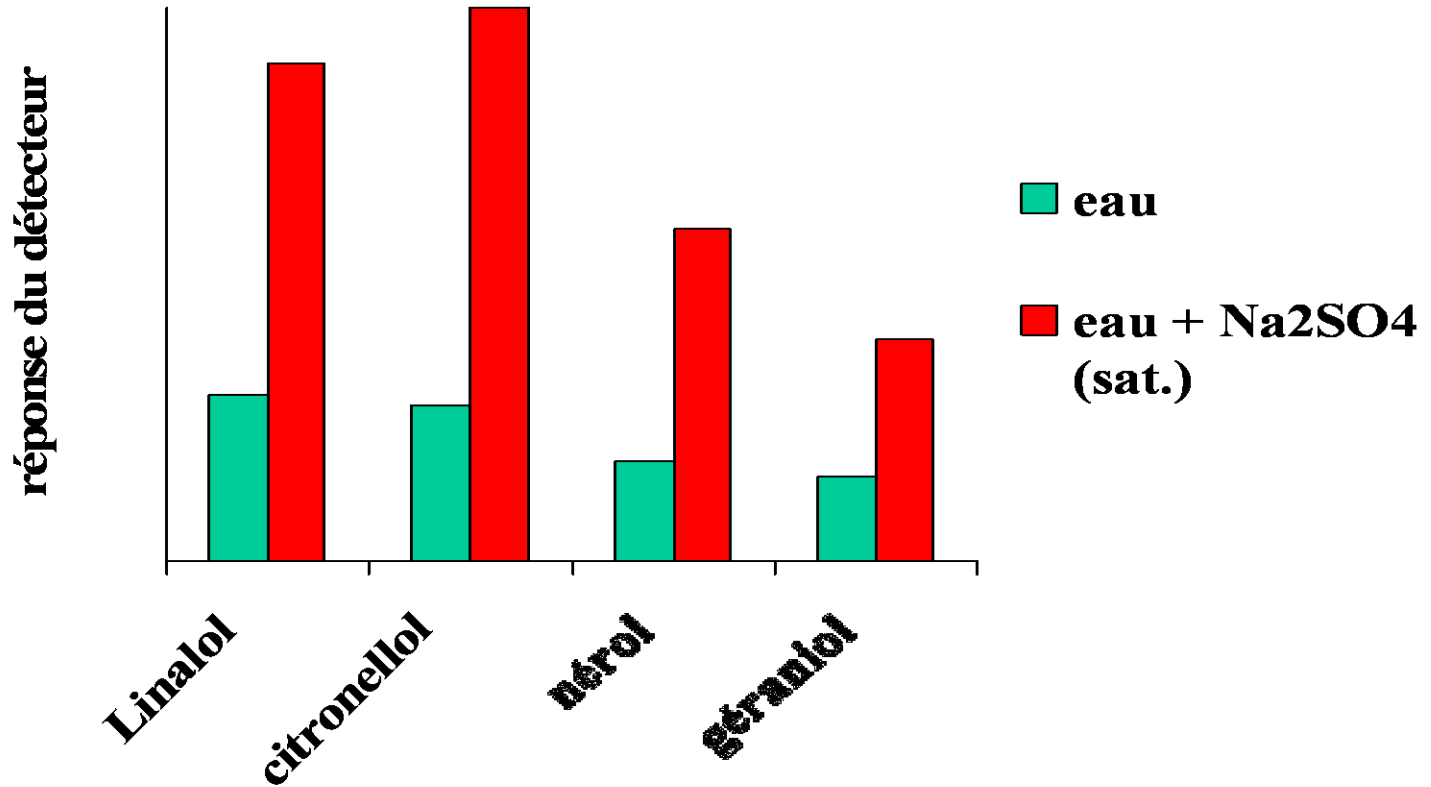
- 30 g de broyat brut de baies de raisins, en présence de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Adsorption sur fibre PA, 30 min., T° ambiante
- Dilution isotopique, CPG-SM, en mode SIM

Choix de la fibre

exemple des terpénols des baies de Muscat



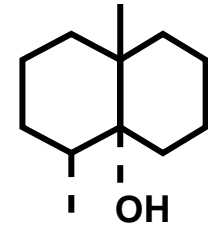
Effet du sel



Goûts moisiss et terreux

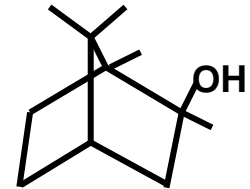
- Géosmine

- Seuil de perception dans l'eau : 10 à 20 ng/L
- Seuil de perception dans le vin : 25 ng/L
- Descripteurs : Terre, betterave rouge



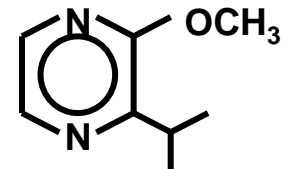
- 2-Méthylisobornéol

- Seuil de perception dans l'eau : 30 ng/L
- Seuil de perception dans le vin : 30 ng/L
- Descripteurs : Terre, moisi, vase, camphre

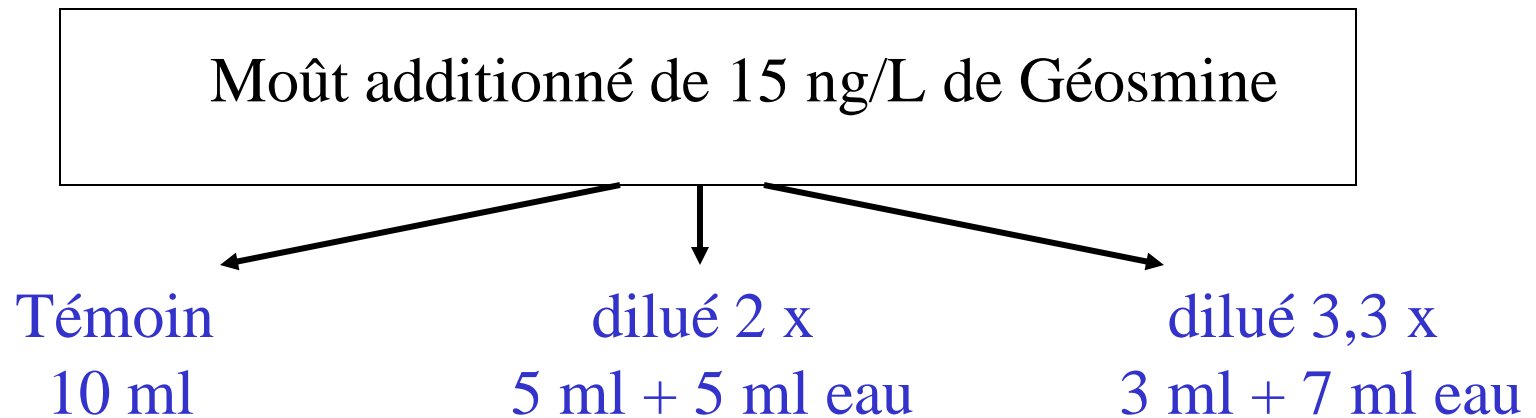


- 2-Isopropyl-3-Méthoxypyrazine

- Seuil de perception dans l'eau : 2 ng/L
- Descripteurs : Pomme de terre, Cosses de petits-pois



Analyse de la géosmine dans les moûts effet de la dilution



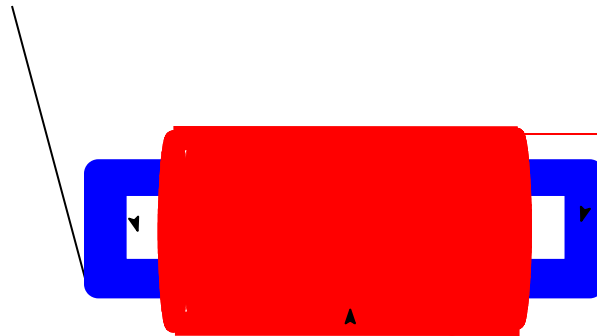
SPME – CPG-MS/MS

S	50	131	147
S/N	6	16	20
LD	8 ppt	5 ppt	2,5 ppt

Extraction par SBSE

- Adsorption de la phase liquide (préférentiel) ou de l'espace de tête de l'échantillon
- Volume important de phase adapté à des volumes de liquide # 10 mL
- Phase de polydiméthylsiloxane (PDMS)

BARREAU AIMANTE avec **ENVELOPPE DE VERRE** L de 1 à 4 cm



COUCHE DE PDMS
épaisseur de 0,3 à 1 mm
volume V_p de 25 à 220 μL

Extraction par SBSE

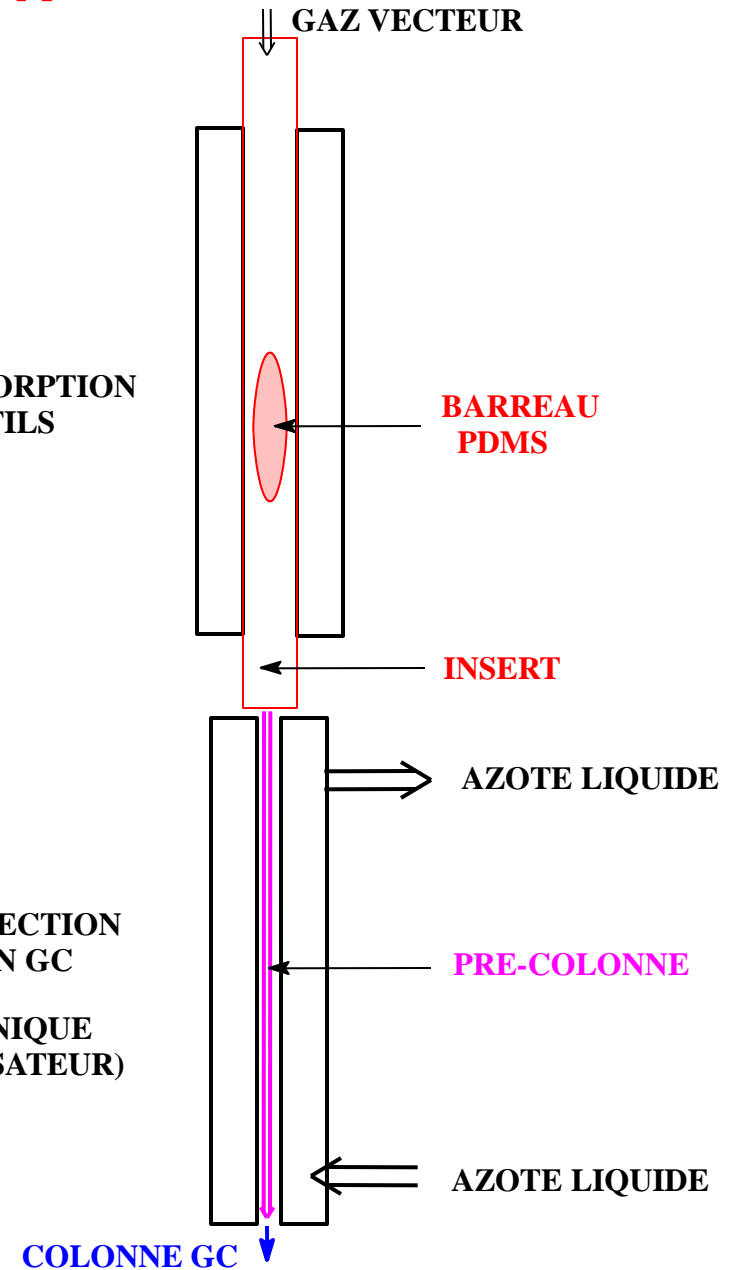


SYSTEME DE DESORPTION/INJECTION SUR COLONNE GC POUR "TWISTER"

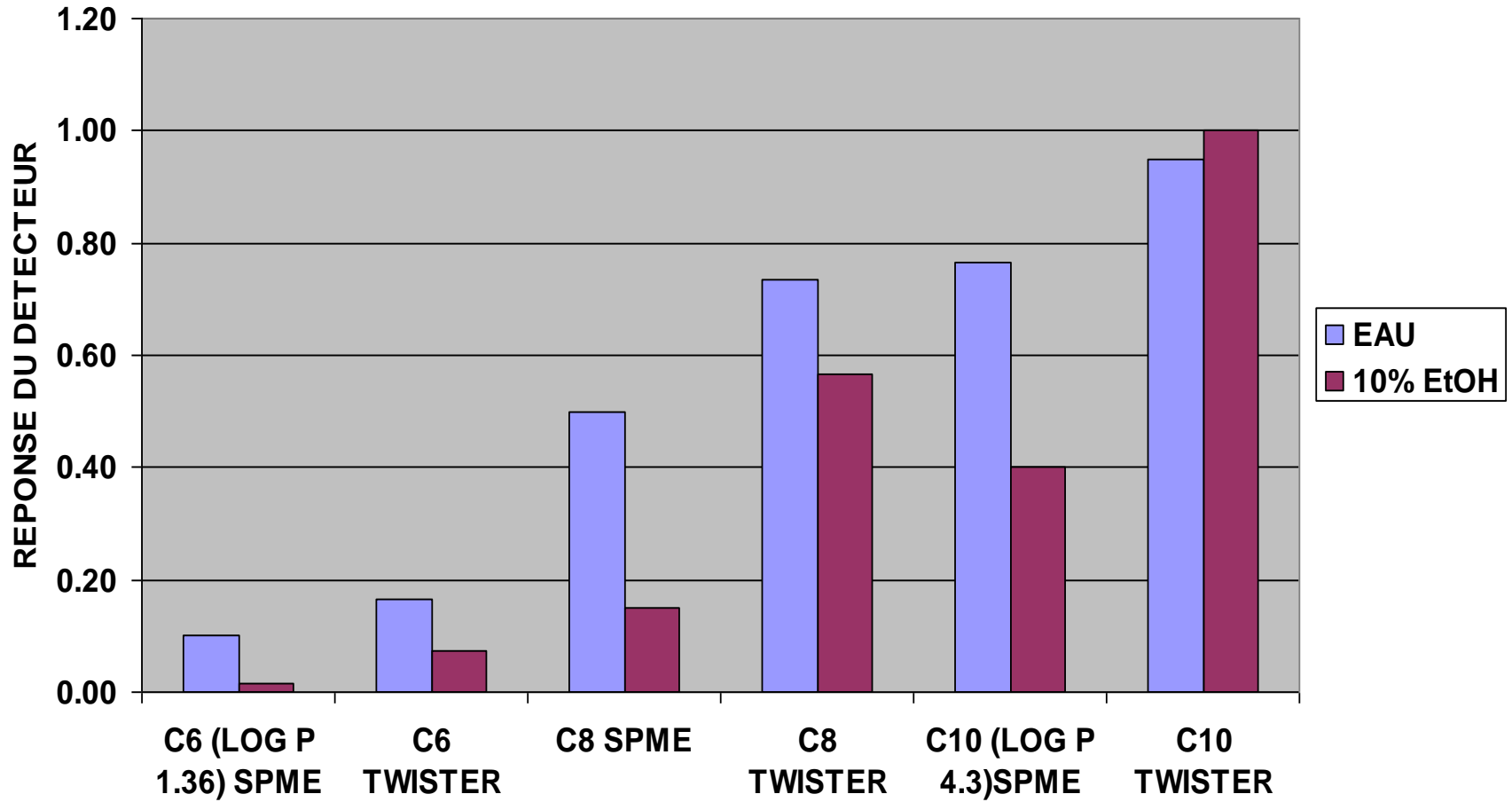
Ensemble des opérations de sorption
et de désorption automatisables

THERMO-DESORPTION
DES VOLATILS

PIEGEAGE ET INJECTION
DES VOLATILS EN GC
(PIEGE CRYOGENIQUE
ET FLASH-VAPORISATEUR)



EFFET DE L'ETHANOL SUR L'EXTRACTION PAR TWISTER ET SPME (DVB/CARBOXEN/PDMS) DE 3 ESTERS METHYLIQUES



MICROEXTRACTIONS SORPTIVES AVEC DESORPTION THERMIQUE

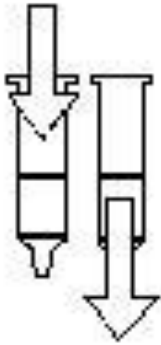
AVANTAGES

- **Absence de solvant organique**
- **Rapidité, miniaturisation**
- **Injection totale et directe de l'extrait en CPG**
- **Interférences et pollutions par des composés de la matrice extraite réduites**
- **Automatisation**

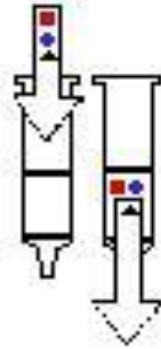
LIMITATIONS

- **Problèmes avec les analytes thermiquement sensibles**
- **Domaine d'utilisation limité (lipophilie des analytes, échantillons hétérogènes)**
- **Modification du système d'injection chromatographique (SBSE)**
- **Contrôle des paramètres de l'extraction**
- **Coût de l'automatisation**

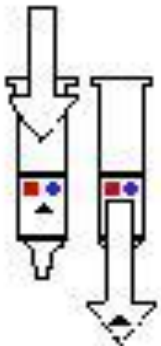
Extraction par SPE



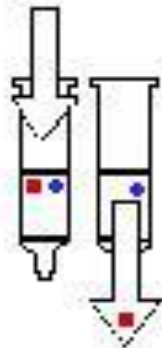
conditionnement



Dépot



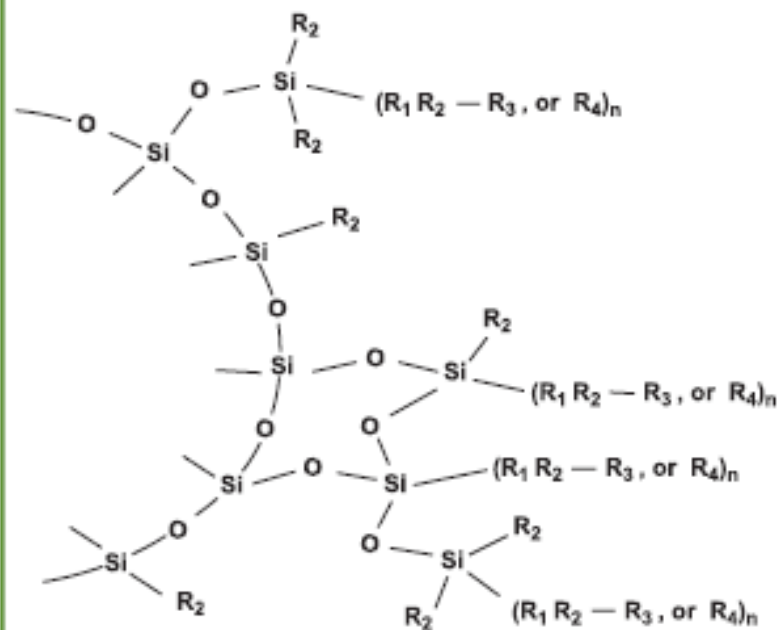
Lavage



Elution

- liaison Van der Waals
- échange d'ions
- affinité (anticorps)
- liaison covalente

Greffon copolymérique



R₁ = C₂, C₈, C₁₈

R₂ = C₂

R₃ = NH₃, CN, DIOL, etc

R₄ = SO₄⁻, CO₂·H, NH₄⁺, NH₂⁺

n = 1, 2, 3, 4, 5,...

Composé d' intérêt	Apolaires (1)	Phases apolaires C18, C8, C6...CH, PH, CN, SDVB...
	Ionisables -basiques -interférents neutres	Echange de cations (2) : CN, CBA, PRS, SCX
	Ionisables -acides -interférents neutres	Echange d'anions (3) : NH ₂ , PSA, SAX
	Ionisables interférents ionisés	Phases apolaires (4) C18, C8...CH, PH, CN, SDVB...
	Non ionisables polaires	<i>La SPE n'est probablement pas adaptée!</i> Le SDVB est parfois une solution mais le méthanol dans l'eau n'est pas du ressort de la SPE!
	Matrice très chargée (fluides bio.)	Mode mixte : Apolaire/cationique (comp. basique) Apolaire/anionique (comp. acide)

- (1) Composés solubles dans l'hexane, l'heptane ou le chloroforme
- (2) Ajuster le pH 2 unités sous le pKa
- (3) Ajuster le pH 2 unités au dessus du pKa
- (4) Neutraliser l'analyte en ajustant le pH

Comparaison des performances des techniques extractives

Prévision de l'extraction de l'analyte en solution par solvant ou phase solide

volume V_e de phase aqueuse

teneur initiale d'analyte m_0

Log P_o (octanol/eau)

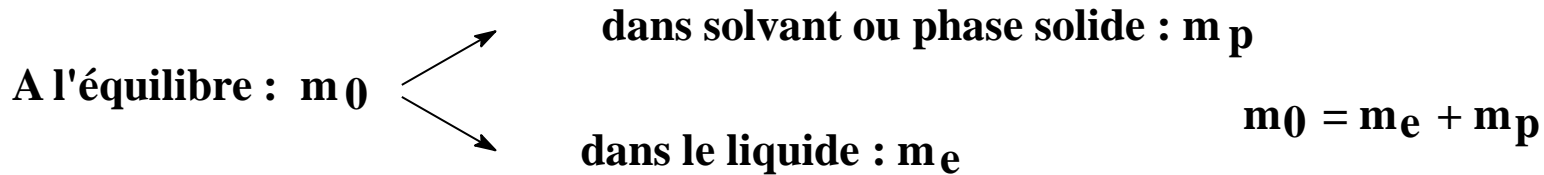
$\beta = V_e/V_p$ $p =$ rapport de phase

Solvant

Phase solide

volume V_p

masse d'analyte extrait m_p



P_o étant évalué empiriquement (Rekker, Hansch),

Si solv., phase/matrice # octanol/eau, l'approximation $P_o \approx P_p$ permet d'obtenir :

$$P_o \approx P_p \approx \frac{m_p/V_e}{V_p/m_e} \approx \beta \frac{m_p}{m_e} \quad \text{soit :} \quad \frac{m_p}{m_0} \approx \frac{P_o/\beta}{1+P_o/\beta}$$

$\left. \begin{array}{l} P_p \nearrow \\ \beta \searrow \end{array} \right\} \begin{array}{l} p \text{ forte affinité} \\ \text{eau faible affinité} \\ \text{pour analyte} \end{array}$

Ex: Pour un composé de

$P_o > 100$ (Log $P_o > 2$)

Solvant pour un $\beta = 10\text{mL} / 0,5 \text{ mL} = 20$

SBSE pour un $\beta = 10\text{mL} / 0,1\text{mL} = 100$

SPME pour un $\beta = 10\text{mL} / 0,001\text{mL} = 10000$

$m_p/m_0 > 83\%$

$\Rightarrow m_p/m_0 > 50\%$

$m_p/m_0 > 1\%$

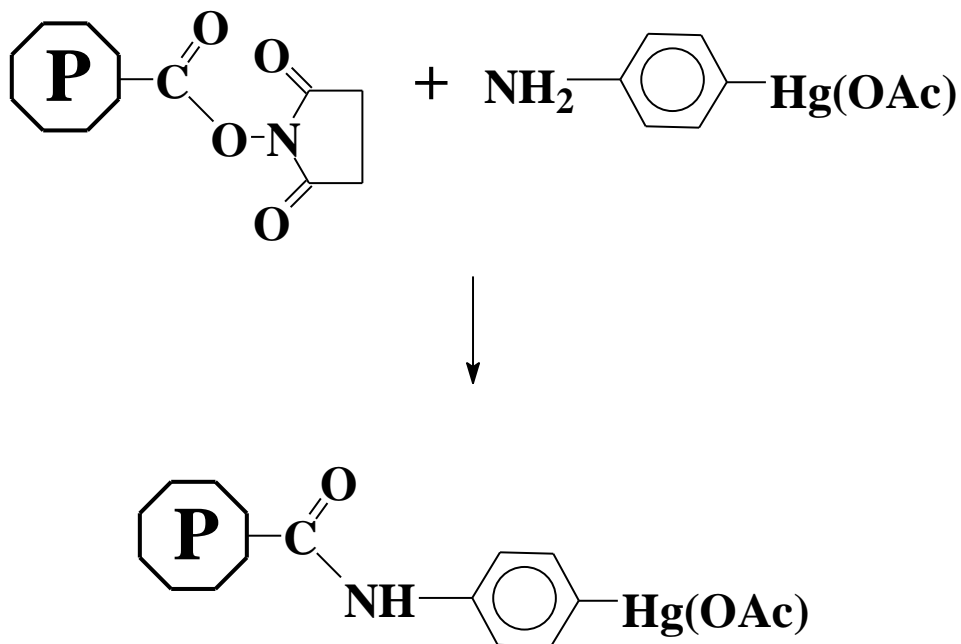
Comparaison des performances des techniques extractives

LIMITES DE DETECTION DE QUELQUES PHENOLS VOLATILS EN $\mu\text{g/L}$ DANS LE VIN PAR SPE/LIQ, SPME ET TWISTER			
EXTRACTION	TWISTER	SPME PDMS	SPE 200 mg STY/DVB
VOL. VIN	3 mL + 12mL EAU	25 mL 13° + SEL 6M	10 mL
DESORPTION	TD	TD	2,5 mL CH ₂ Cl ₂
GC/DETECTION	GC/SIM-MS	GC/FID	GC/FID
4-ETHYL PHENOL	6	2	480
4-ETHYL GAIACOL	159	1	1130
4-VINYL PHENOL	373		1590
4-VINYL GAIACOL	67		2240
TWISTER	DIEZ et al., 2004		
SPME	MARTORELL et al., 2002		
SPE	DOMINGUEZ et al., 2002		

Utilisation de la liaison covalente

Exemple de la purification d'extraits par chromatographie covalente pour l'analyse des thiols

AFFIGEL 10

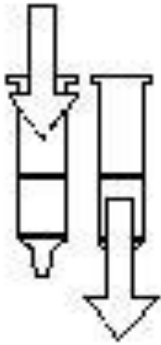


AFFIGEL 501

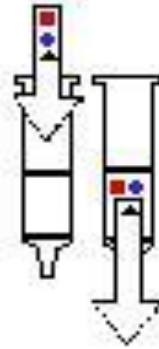
2.3- Exemples de méthodes utilisées pour les précurseurs d'arômes

- **extraction par SPE**
- **“méthodes indirectes”**

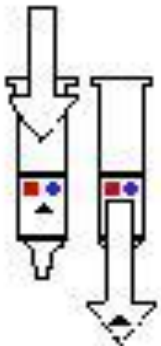
Extraction par SPE



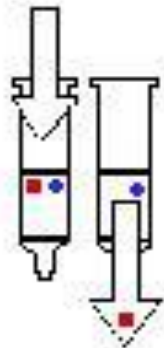
conditionnement



Dépot



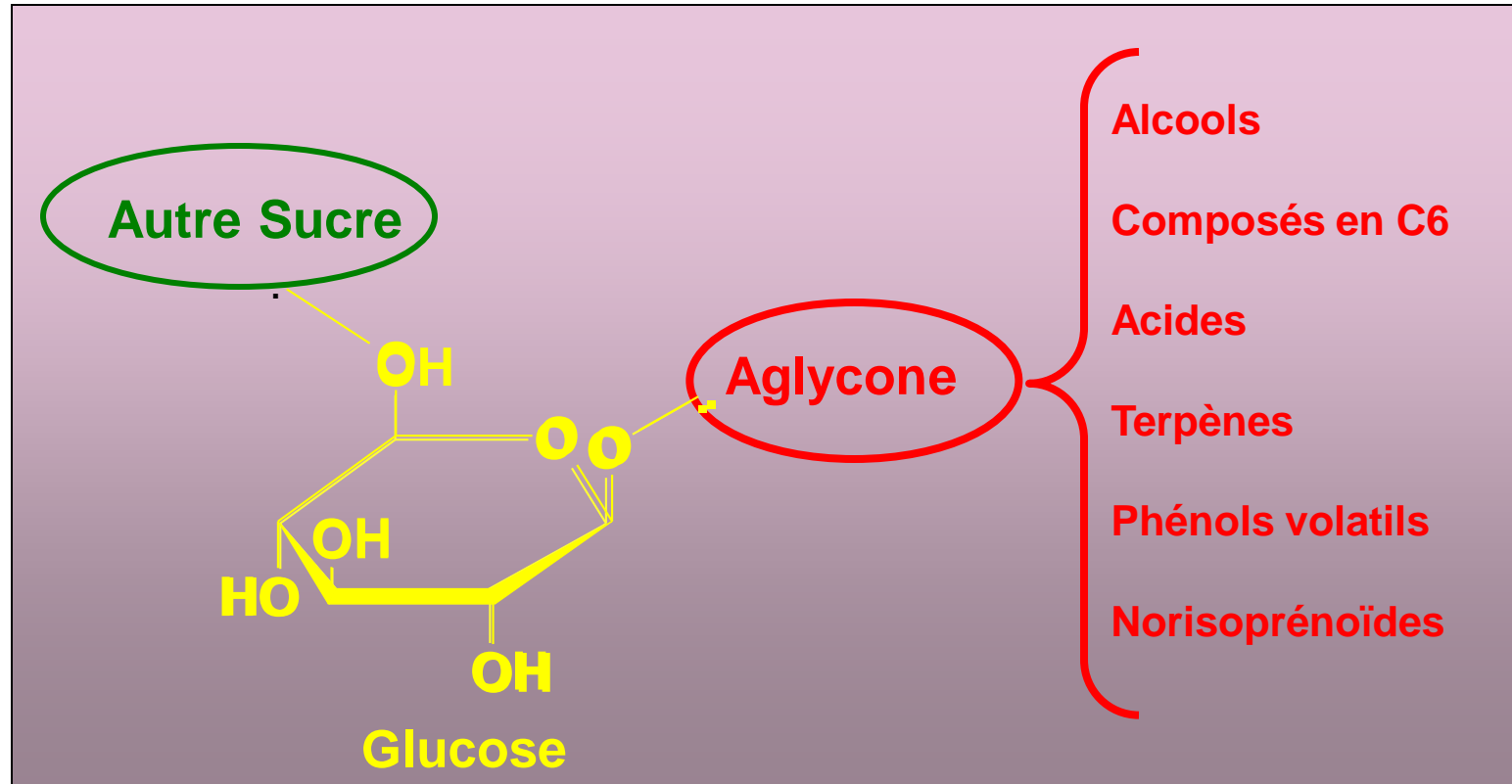
Lavage



Elution

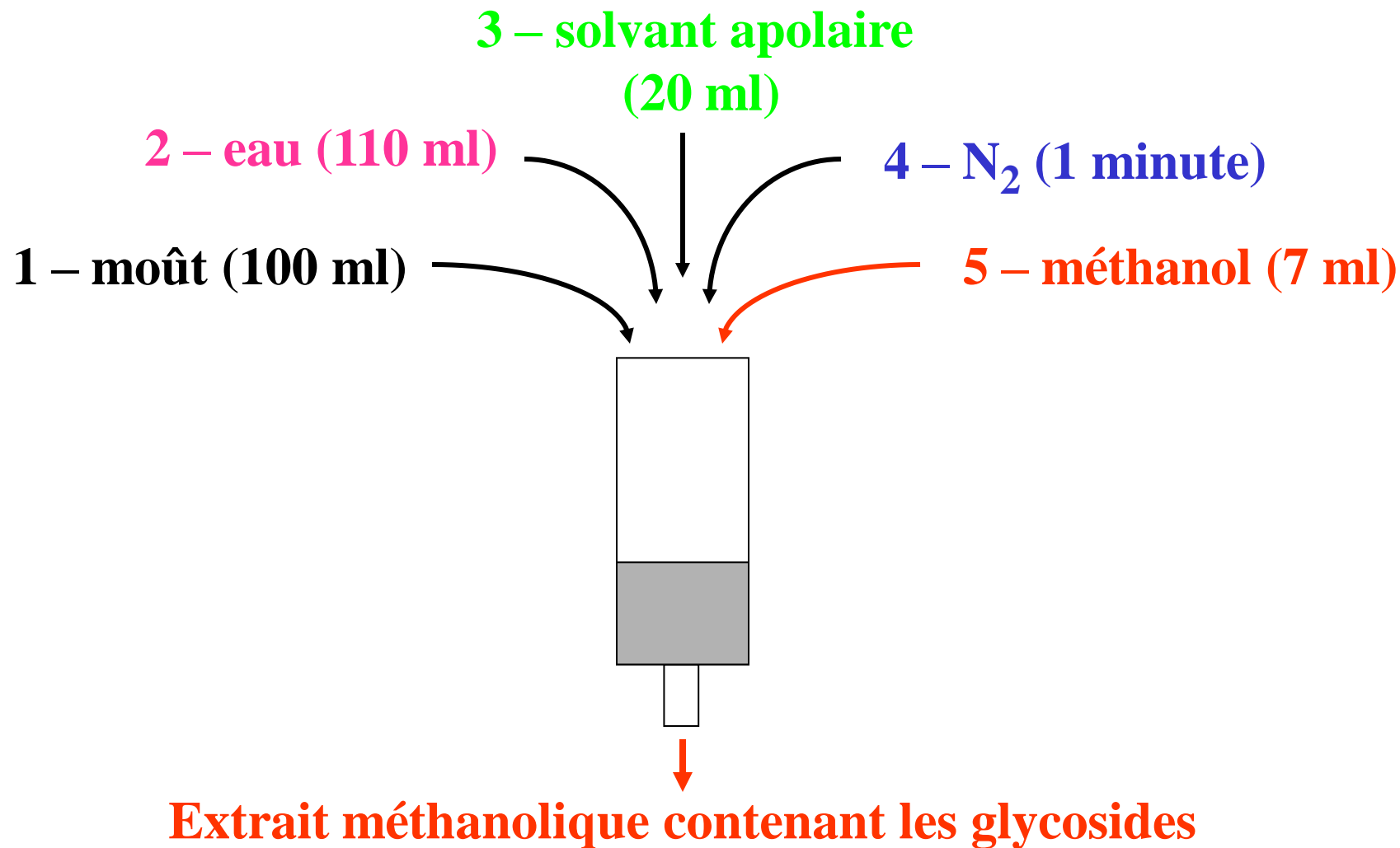
- liaison Van der Waals
- échange d'ions
- affinité (anticorps)
- liaison covalente

Exemple de l'extraction des glycosides de composés d'arôme du raisin

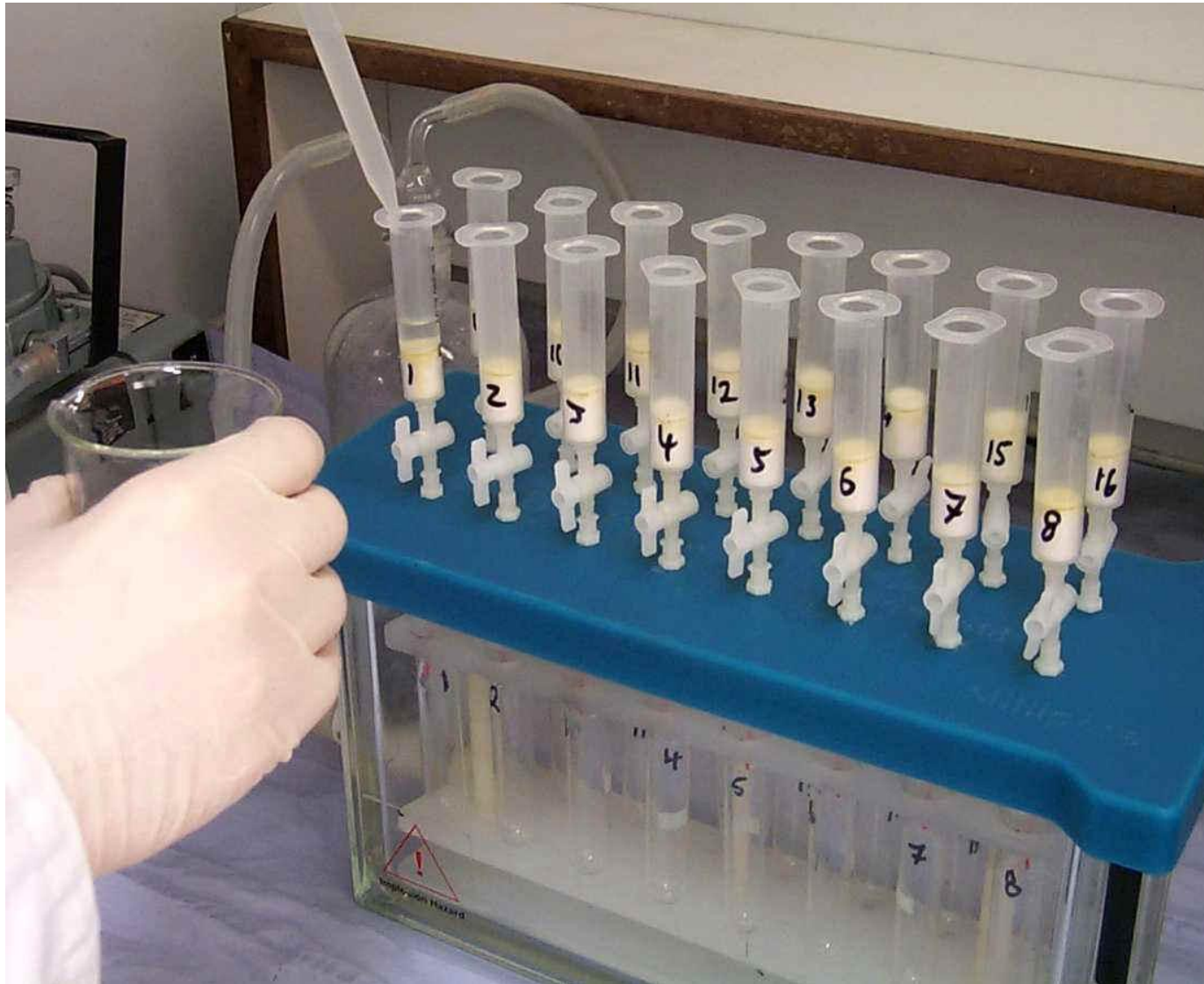


EXTRACTION DES GLYCOSIDES

Principe général de l'extraction



Extraction par SPE des glycosides

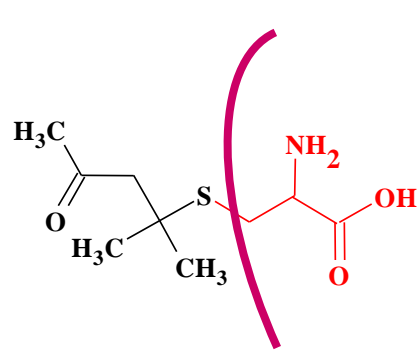


Extraction par SPE des glycosides automatisée

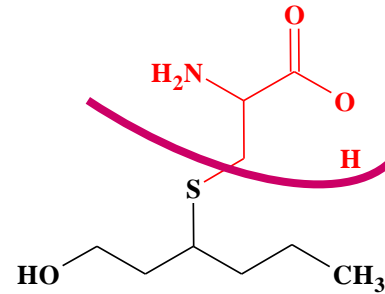


Utilisation de résine échangeuse d'ions

Cas des précurseurs cystéinylés

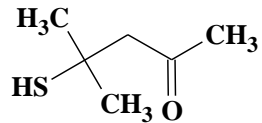


S-4-(4-méthylpentan-2-one)-L-cystéine

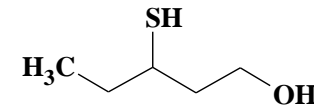


S-3-(hexan-1-ol)-L-cystéine

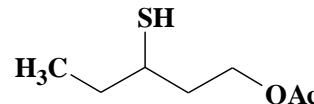
levure



4-mercapto-4-méthylpentan-2-one
0,8 ng/L



3-mercaptohexan-1-ol
60 ng/L

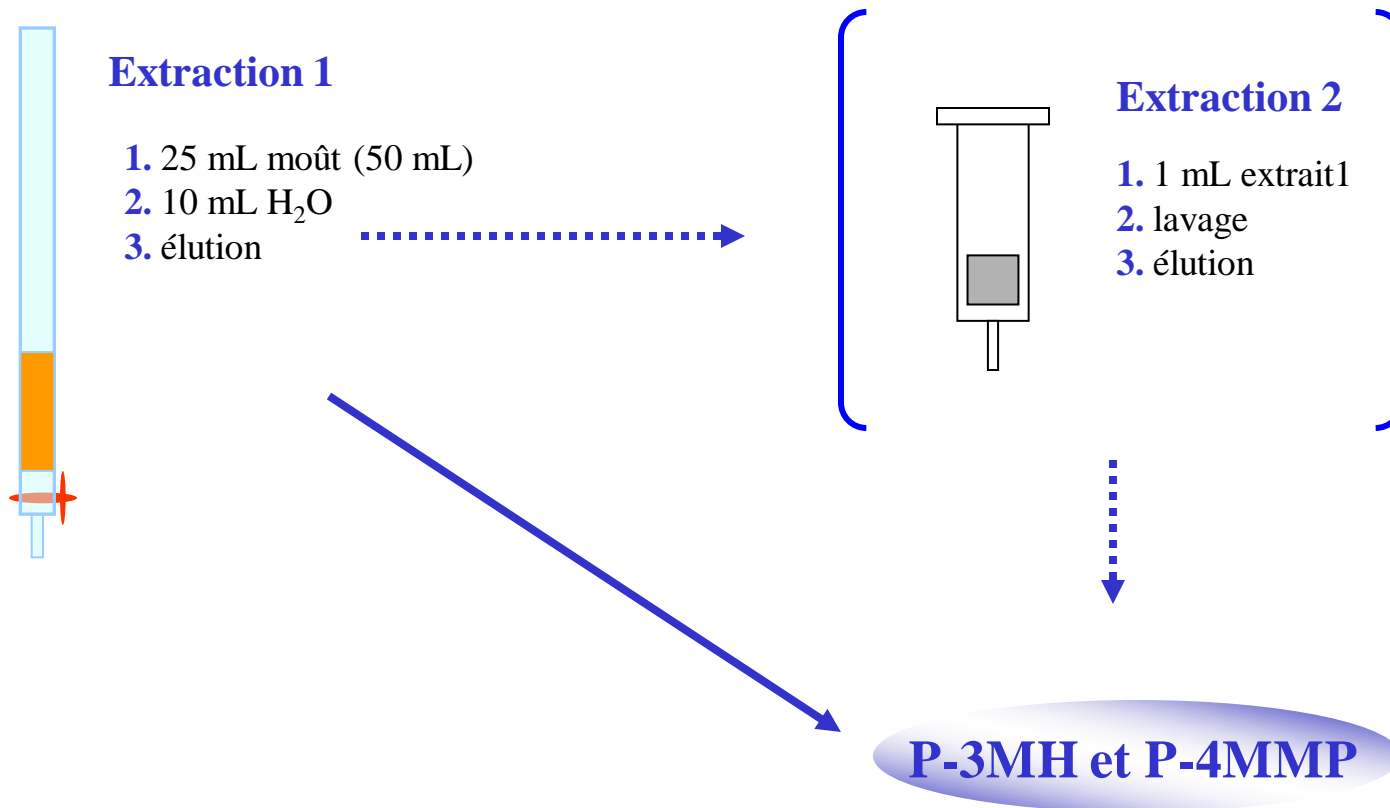


Acétate de 3-mercaptohexyle
4 ng/L

levure

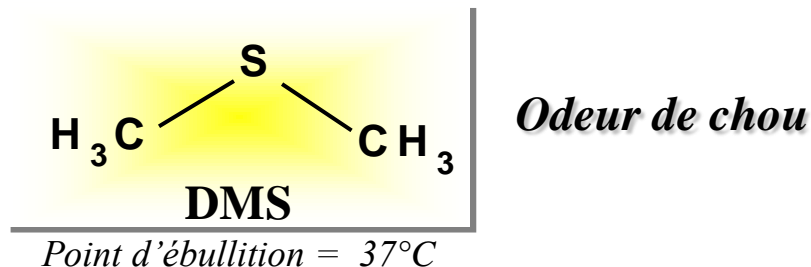
Utilisation de résine échangeuse d'ions

Cas des précurseurs cystéinylés



Utilisation de méthodes indirectes

Cas des précurseurs du DMS



- Présence marquée dans les vins blancs et rouges évolués, et particulièrement pour les vins issus de raisins en surmaturité
- Influence aromatique: **Défaut / Qualité**

truffe, olive, fruits rouges, asperge, foin, chou...

Origine

•DMSO

•Dérivés d'acides aminés sulfurés

Fermentation
Saccharomyces cerevisiae


DMS

~~DMSO PDMS~~

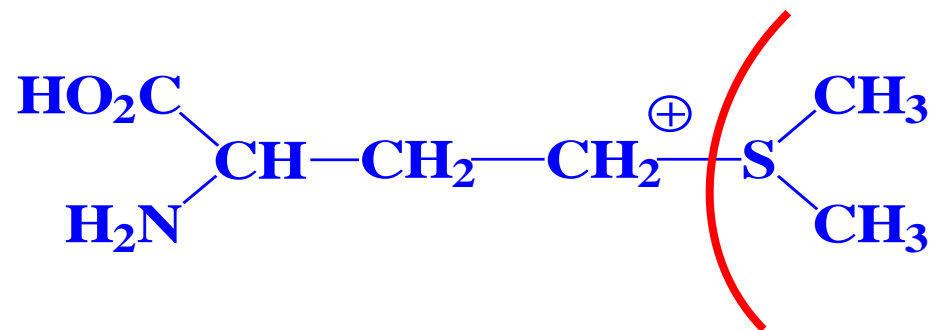
Vieillesse en
bouteille

DMS

Utilisation de méthodes indirectes

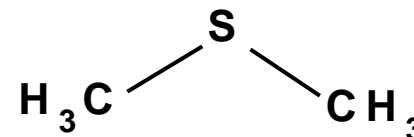
Cas des précurseurs du DMS

Jus de raisin, Vin



DMS

(« PDMS »)



DMS libre

HS-SPME / Dilution isotopique ($[\text{}^2\text{H}_6\text{]}\text{-DMS}$) / CPG-IESM (SIM)

Potentiel en DMS

- Traitement thermique alcalin (*Swan, 2000*)
- Analyse du DMS libéré: « PDMS »

3- Méthodes d'analyse

3.1- Méthodes séparatives :

la méthode de choix, la CPG

3.2 - Méthodes globales :

exemple de l'IRTF

∴

La chromatographie

La chromatographie est une technique analytique qui permet la **séparation** des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse.

Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la **phase stationnaire** (emprisonnée dans la colonne) et la **phase mobile** qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la **colonne**.

Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure, ...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité, ...).

A leur arrivée en bout de colonne, le **détecteur** mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

La chromatographie en Phase Gazeuse

La CPG s'applique à des échantillons gazeux, ou susceptibles d'être vaporisés sans décomposition.

La phase mobile est alors un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé **gaz vecteur**, qui balaie en permanence la colonne. Cette dernière, placée dans un **four** thermostaté, est un tube de faible section enroulé sur lui-même et contenant la phase stationnaire. Un grand choix de détecteurs permet l'analyse sélective et parfois l'identification de mélanges très complexes.

Si la phase stationnaire est un liquide non ou peu volatil, possédant des propriétés de solvant vis-à-vis des composés à séparer, on parle de chromatographie gaz-liquide ou **chromatographie de partage**.

Si la phase stationnaire est un solide absorbant (silice, alumine, zéolites ou autres polymères adsorbants), c'est de la chromatographie gaz-solide ou **chromatographie d'adsorption**.

La Chromatographie en phase gazeuse

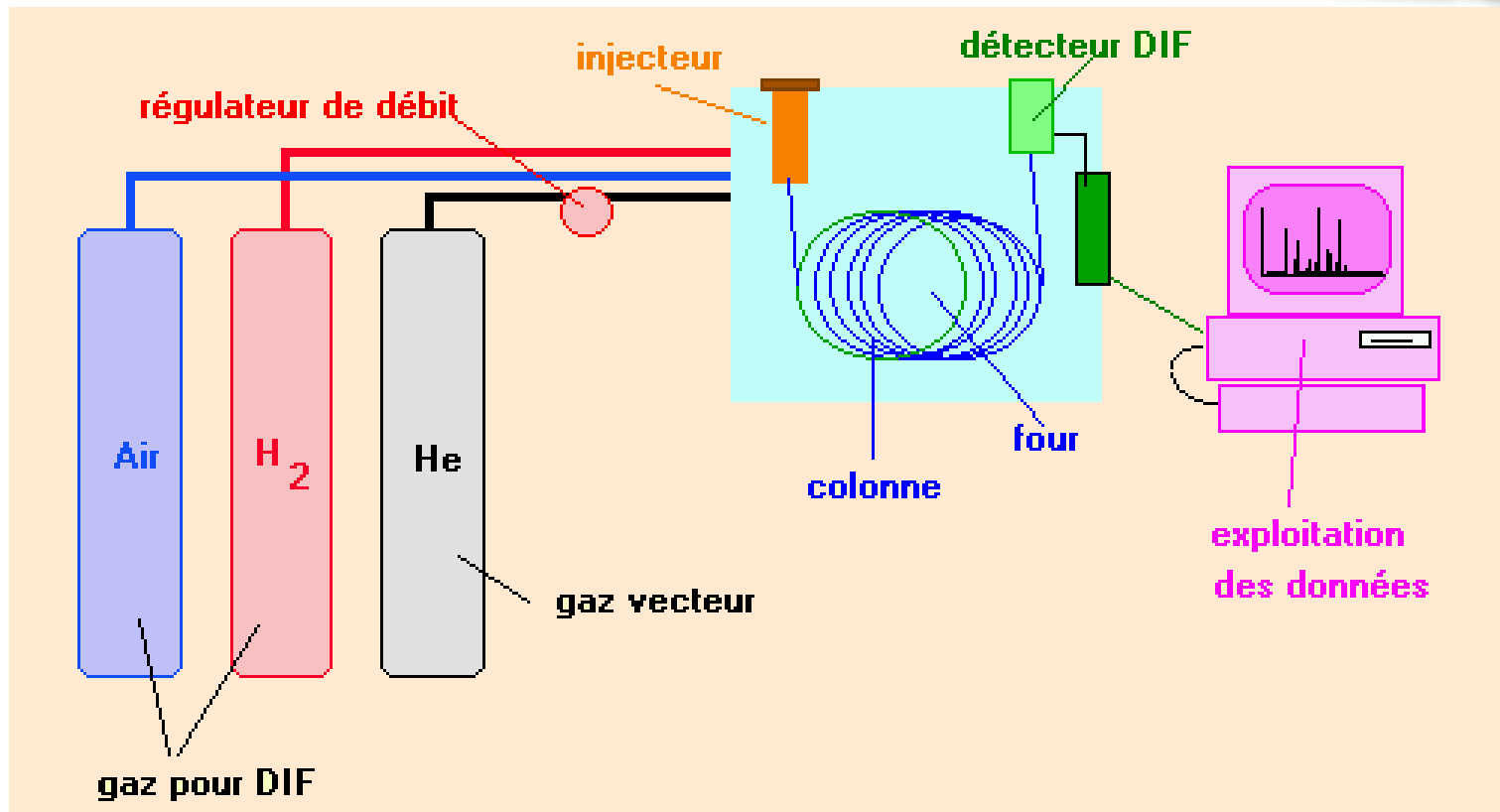
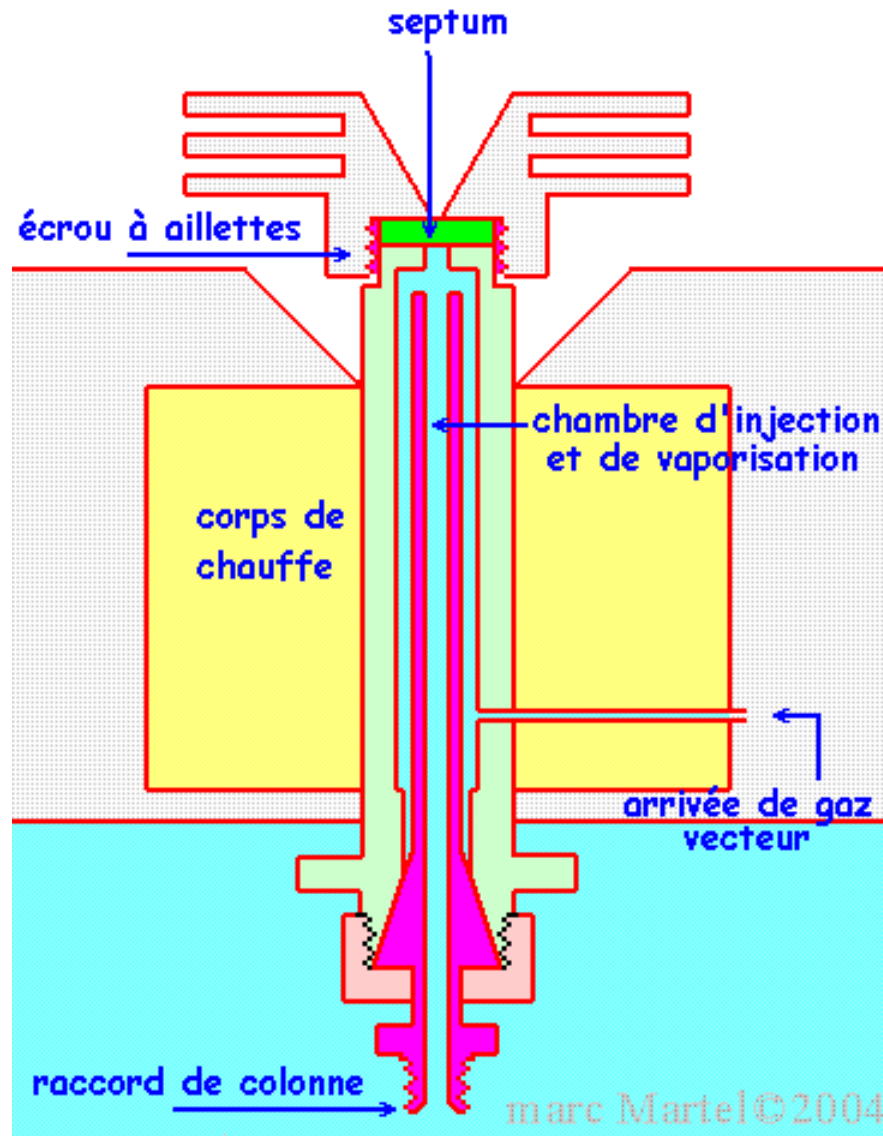
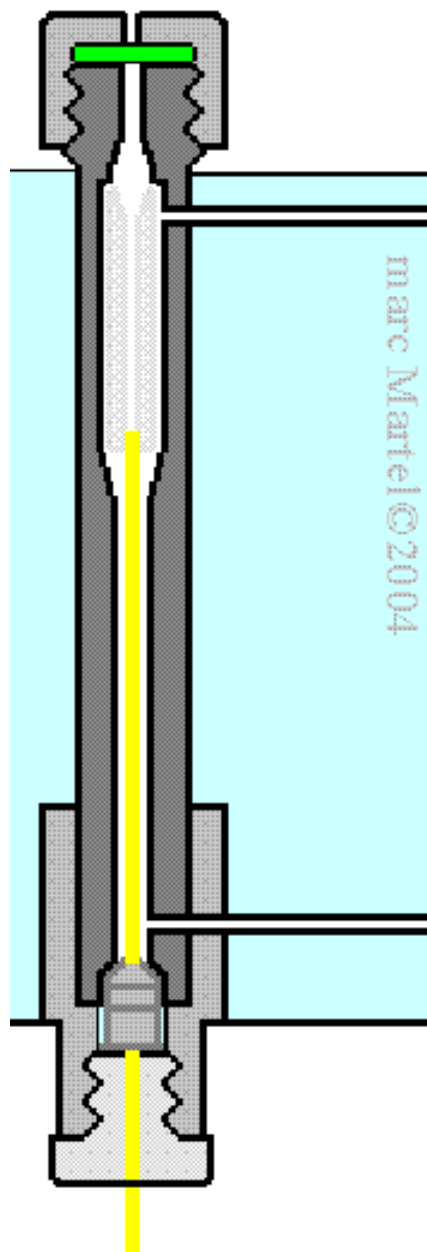


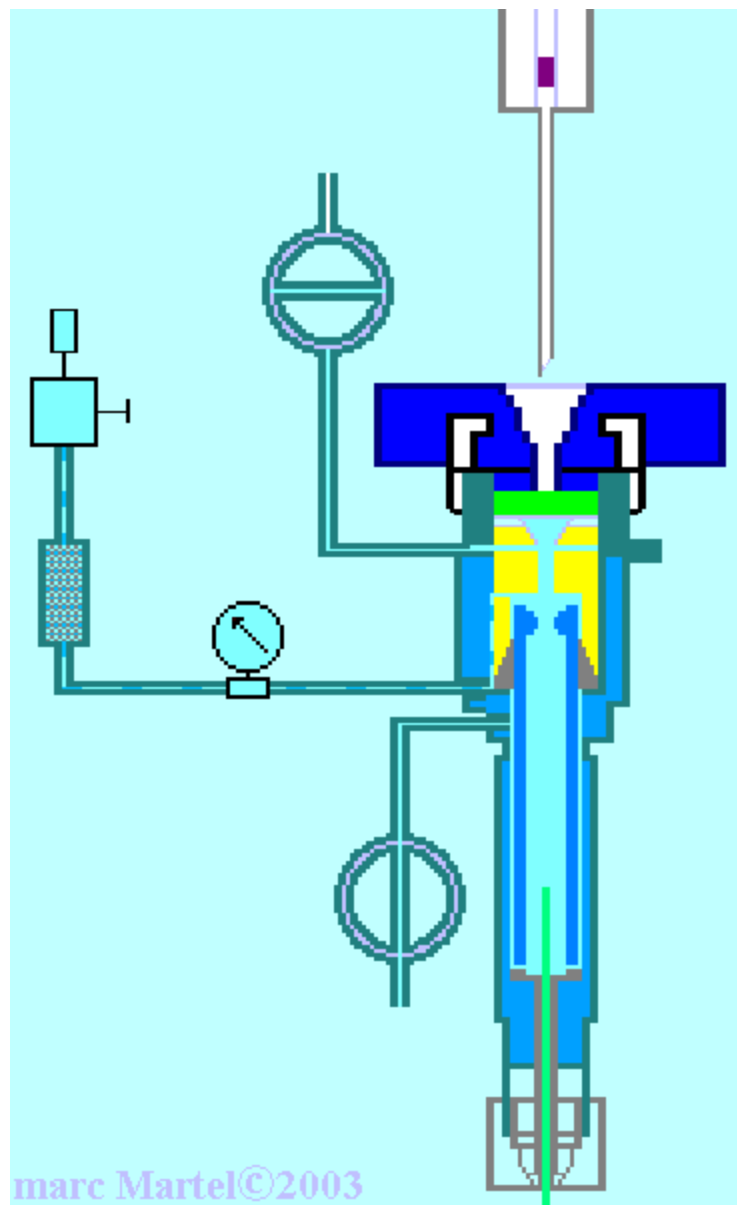
Schéma général d'un injecteur



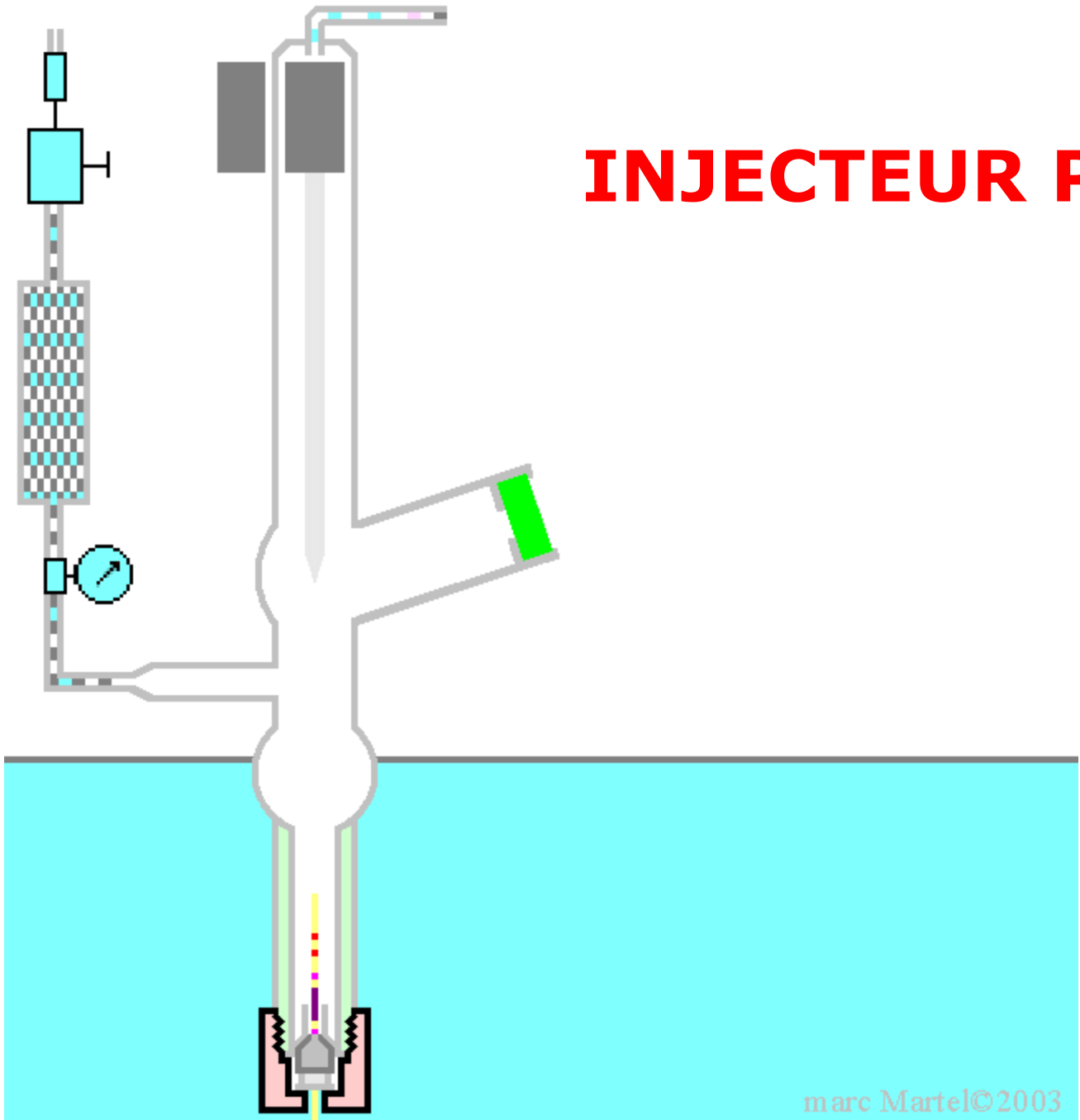
« ON-COLUMN »



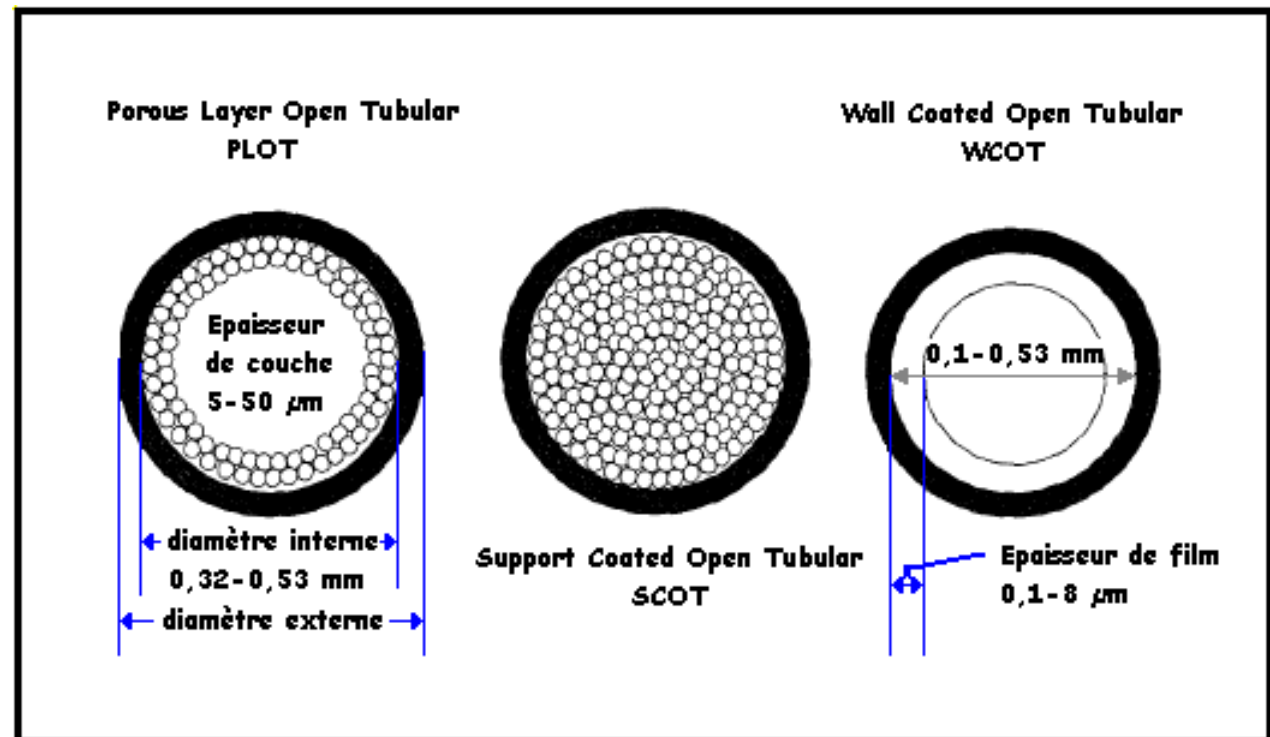
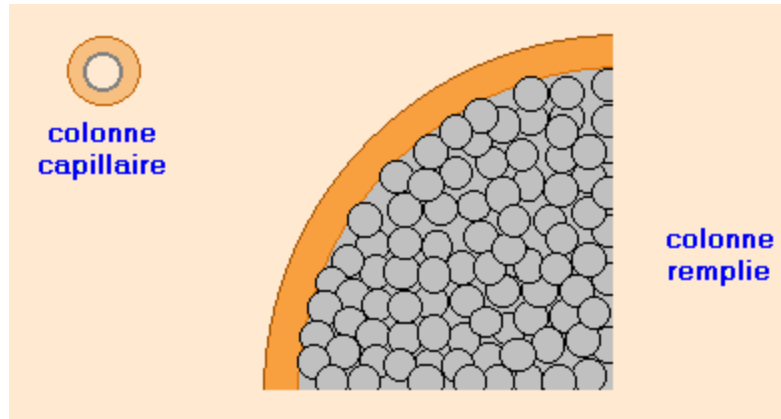
SPLIT-SPLITLESS



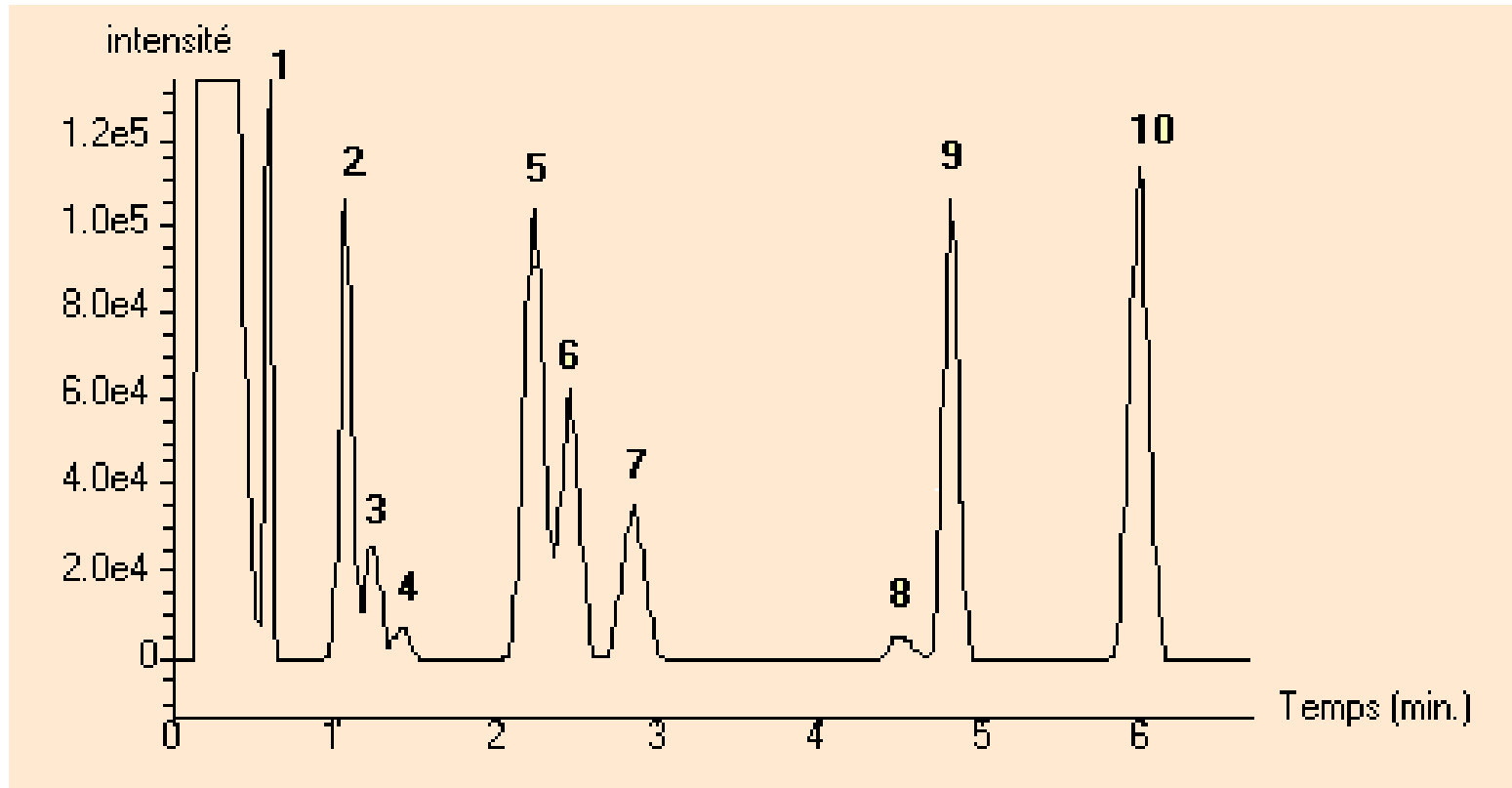
INJECTEUR PTV



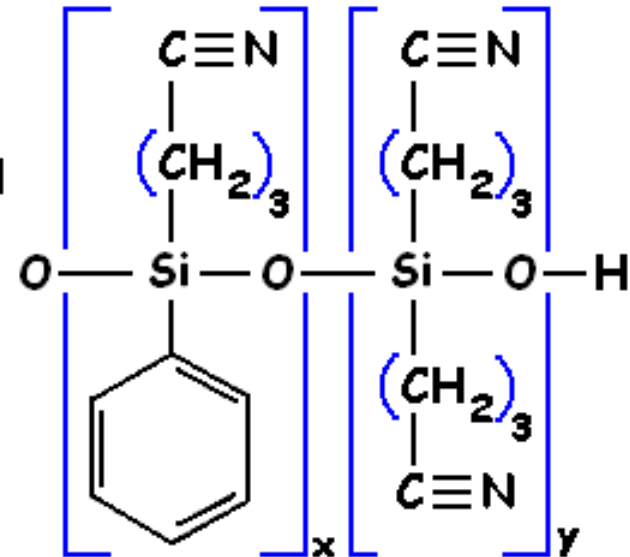
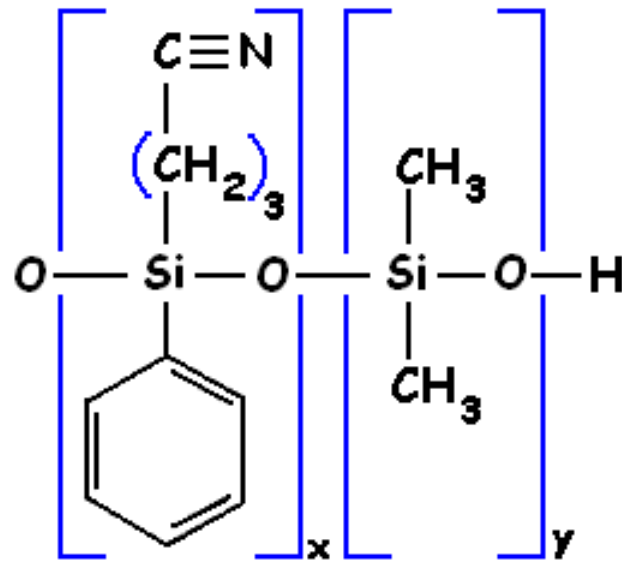
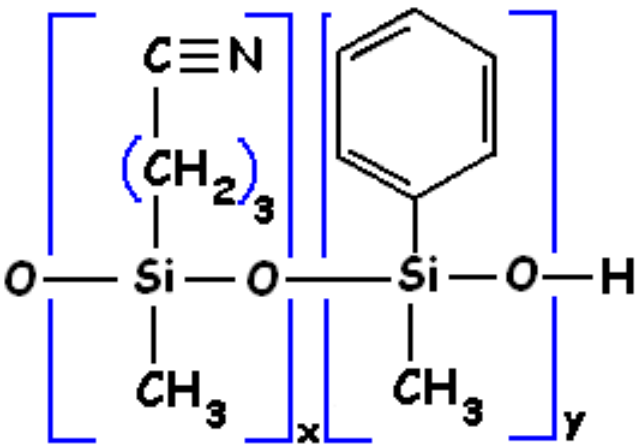
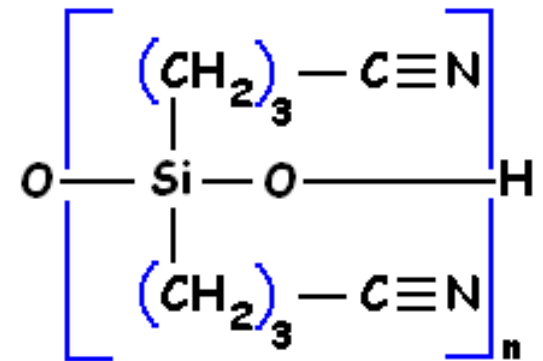
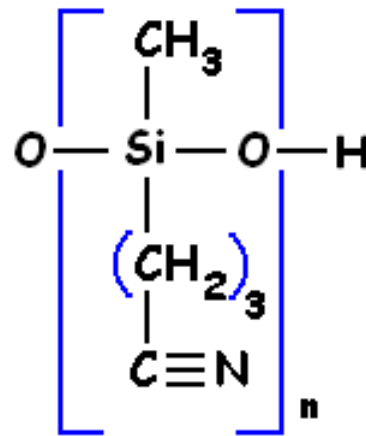
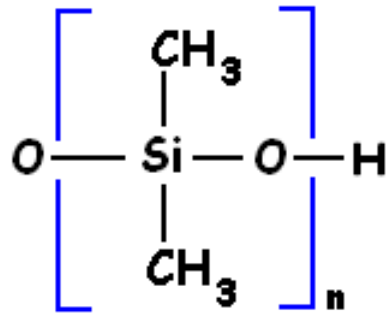
LA COLONNE CHROMATOGRAPHIQUE



Exemple de séparation chromatographique



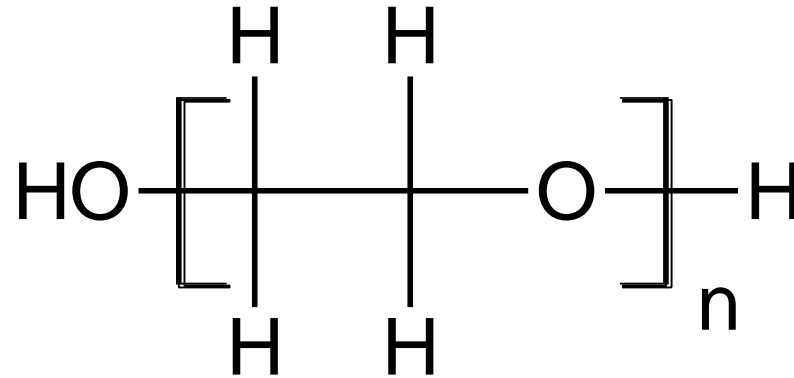
Exemple de phases



Choix des phases

Molécules	Exemples	Phases stationnaires
non-polaires liaisons C-H et C-C	hydrocarbures normaux (n-alcanes)	SPB-octyl
		poly(méthylsiloxane), SE-30
		SPB-5, PTE-5, SE-54
polaires liaisons C-H et C-C liaisons C-Cl, -Br, -F liaisons C-N, -O, -P, -S	alcools, éthers, thiols, amines, acides carboxyliques, esters et cétones	poly(méthylphénylsiloxane)
		poly(cyanopropylméthylsiloxane)
		PEG, Carbowax 10, 20M
polarisables liaisons C-H et C=C et acétyléniques	alcènes aromatiques	poly(cyanopropylsiloxane)
		poly(cyanopropylphénylsiloxane)
		TCEP

Une phase très utilisée pour les arômes des vins : Poly Ethylène Glycol



Non-gréffée : CarboWax 20M

Gréffée : DBWAX

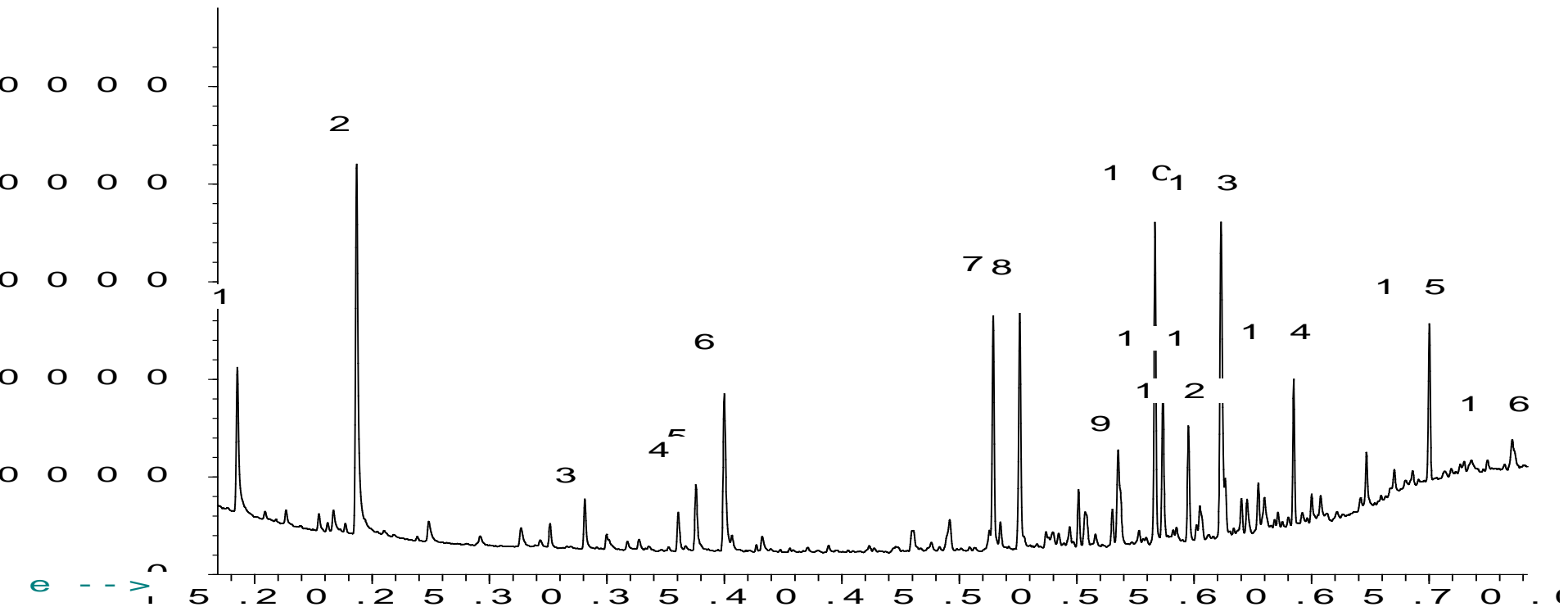
Polaire

Stable de 20°C à 250°C

Exemple de séparation Chromatographique sur DBWAX

T I C : M U S D E _ 1 5 . D (+ , -)

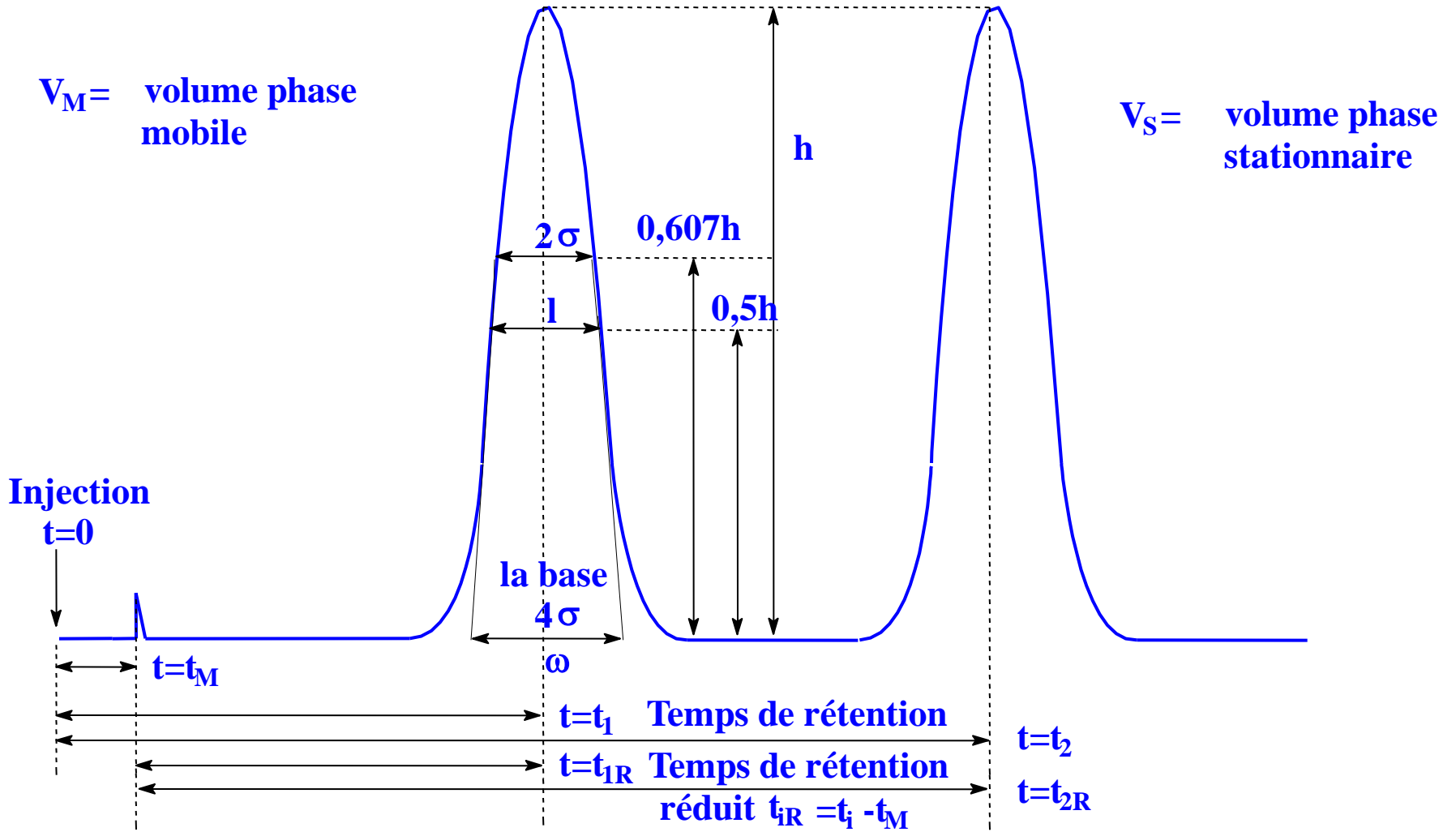
a n c e



Plus de 70 composés dont :

(1) – Hexanol, (2) - 4-Nonanol , (3) - α -Terpineol, (4) – Geraniol, (5) – Benzylic alcohol, (6) – 2-Phenylethanol, (7) – *E*-8-Hydroxylinalool, (8) – *Z*-8-Hydroxylinalool, (9) – 9-Hydroxymegastigm-7-en-3-one , (10) – *p*-Menth-1-*rn*-7,8-diol, (11) – 3-Hydroxy- β -damascone, (12) – Megastigm-7-en-3,9-diol, (13) – 3-oxo- α -ionol, (14) – 3-Hydroxy-7,8-dehydro- β -ionol, (15) – 4,5-Dihydrovomifoliol, (16) - Vomifoliol

GRANDEURS DE RETENTION



GRANDEURS FONDAMENTALES

$$\alpha \text{ Sélectivité d'une colonne} = \frac{t_{2R}}{t_{1R}} = \frac{t_2 - t_M}{t_1 - t_M} = \frac{K_i}{\beta}$$

(pour 2 composés)

$$t_i = t_M (1+k_i) \implies \alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$$

$$R \text{ Résolution d'une colonne} = 2 * \frac{t_{2R} - t_{1R}}{\omega_1 + \omega_2} = \frac{\alpha - 1}{4\alpha} \sqrt{N_{\text{eff}}} = \frac{\alpha - 1}{4\alpha} \left(\frac{k_i}{1+k_i} \right) \sqrt{N}$$

pour 2 composés

Séparation complète $R=1$

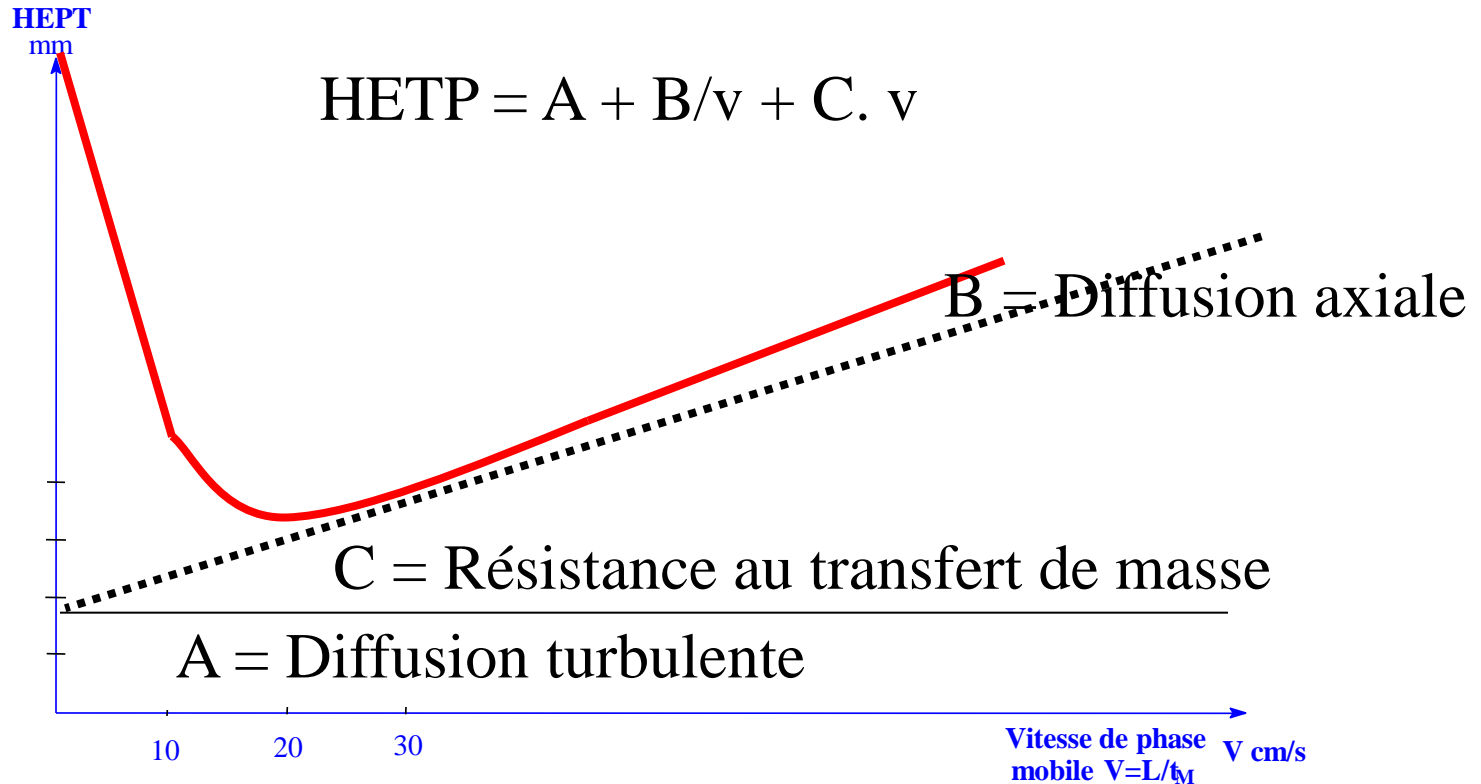
Efficacité d'une colonne

$$N \text{ Nombre de plateaux théoriques} = 16 * \left(\frac{t_{iR}}{\omega_i} \right)^2 = 5,54 * \left(\frac{t_{iR}}{1} \right)^2 = \left(\frac{t_{iR}}{\sigma_i} \right)^2$$

$$N_{\text{eff}} \text{ Nombre de plateaux théoriques efficaces} = 16 * \left(\frac{t_{iR}}{\omega_i} \right)^2 = 5,54 * \left(\frac{t_{iR}}{1} \right)^2 = \left(\frac{k_i}{1+k_i} \right)^2 * N$$

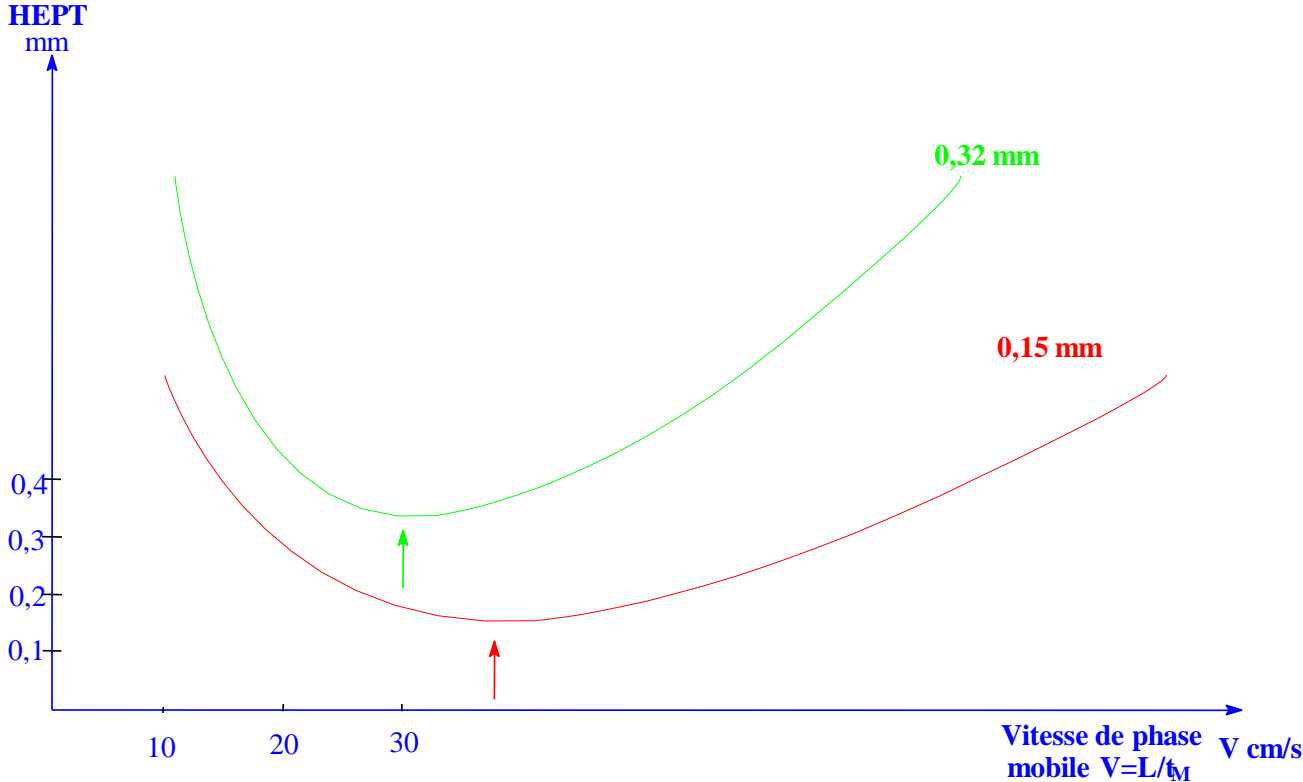
HEPT Hauteur équivalente à un plateau théorique = Longueur colonne/N

Equation de Van Deemter



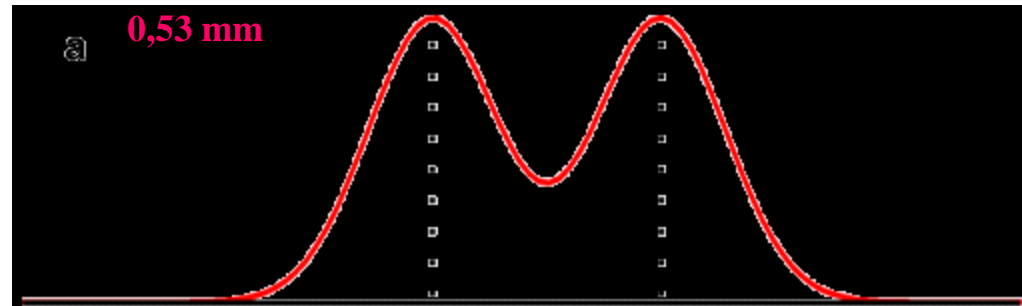
N et HETP dépendent de l'étalement du soluté par des phénomènes cinétiques: Diffusion axiale, résistance au transfert de masse (dans chacune des phases), hétérogénéité d'écoulement (chemins multiples). La théorie cinétique a conduit à des équations donnant HETP en fonction de la vitesse de la phase mobile: Equation de Van Deemter (CPG) et de KNOX (CPL)

Courbe de Van Deemter

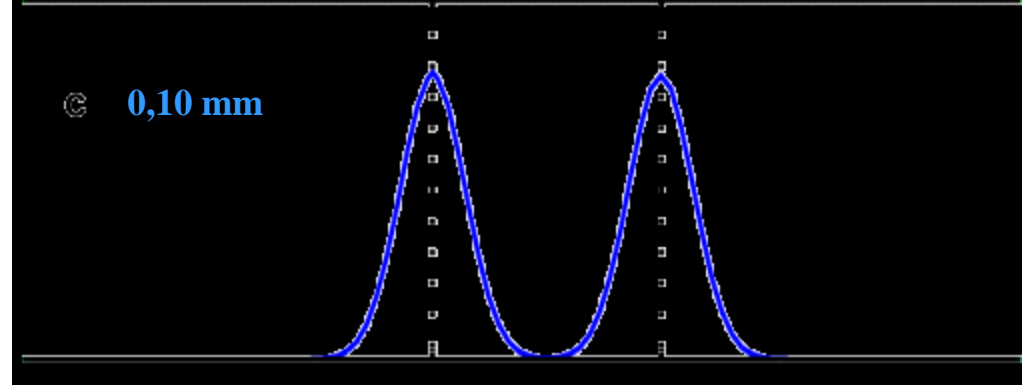
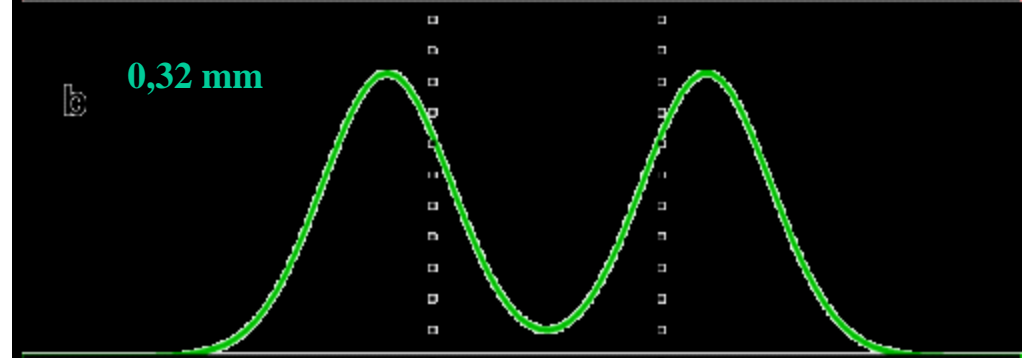


Augmentation de la résolution

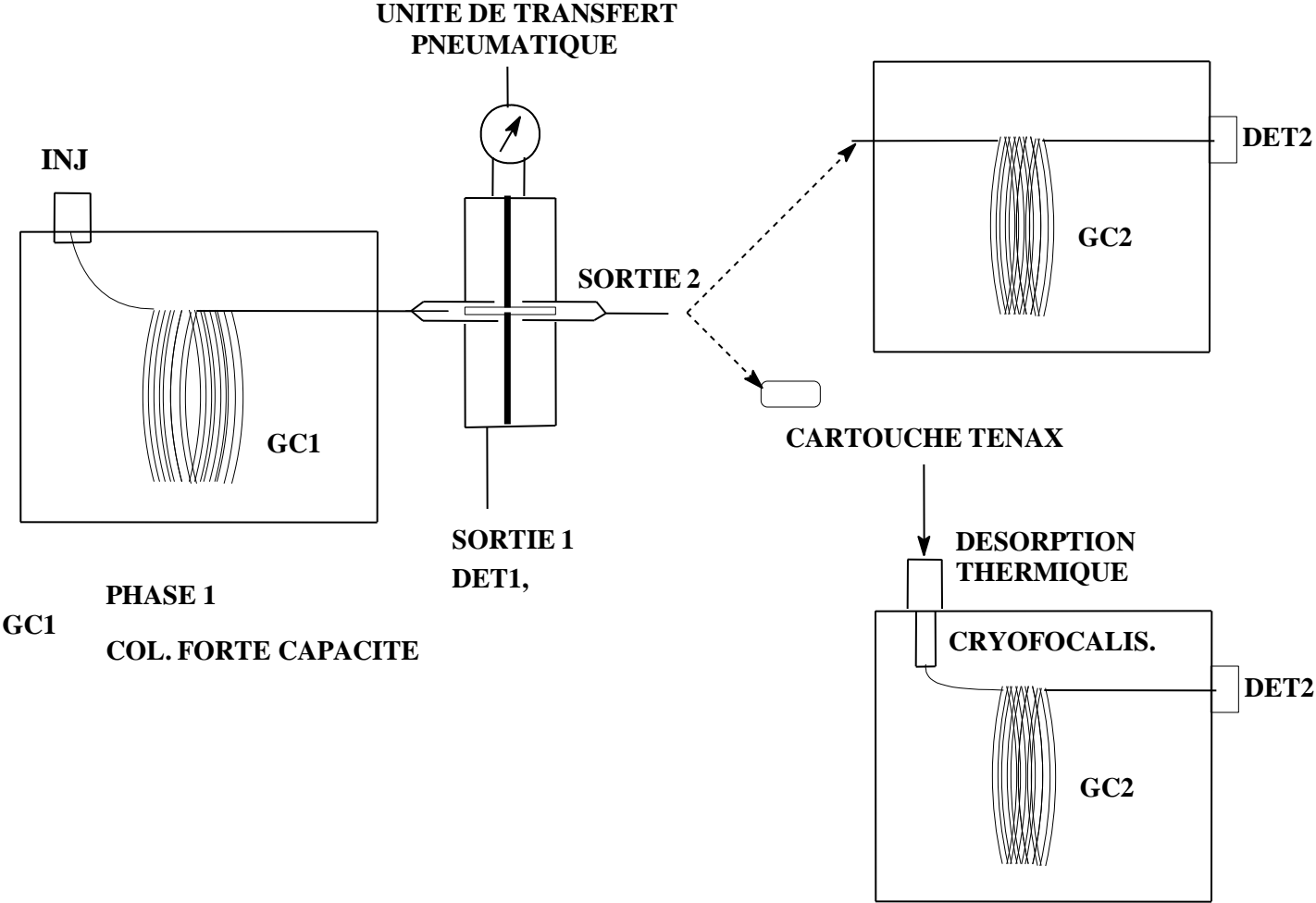
$N = 10\,000$



$N = 500\,000$

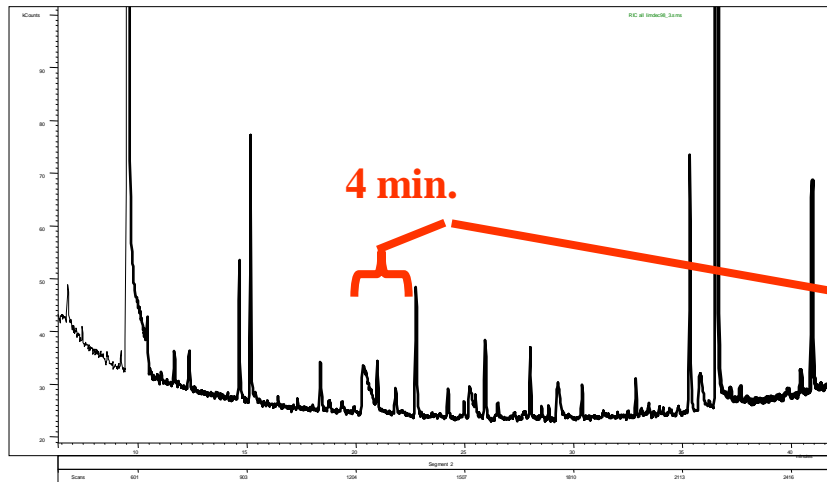


Chromatographie double dimension



Chromatographie double dimension

Injection d'un extrait sur une colonne polaire de type DBWax



Adsorption sur une cartouche de tenax

2,3-butanediol
acide isobutyrique
dioxolane
 γ -butyrolactone

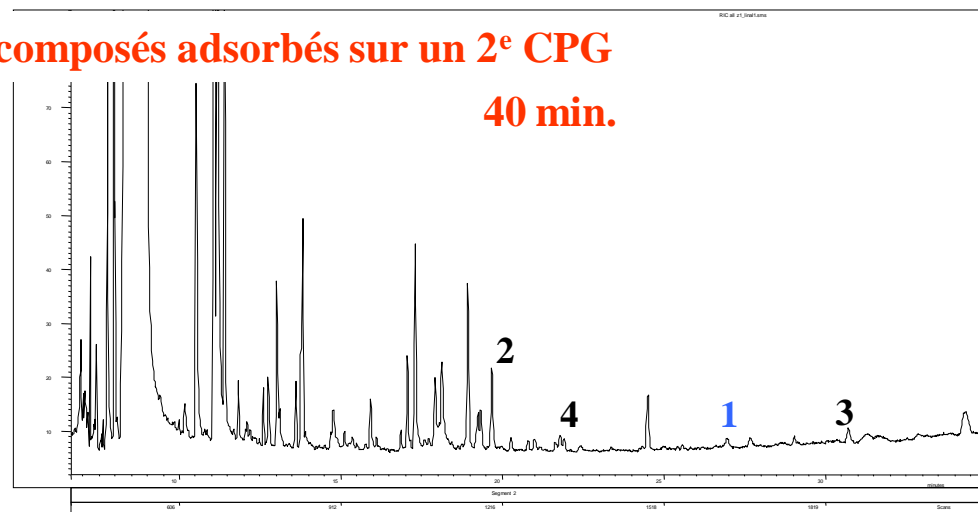


Désorption thermique des composés adsorbés sur un 2^e CPG

40 min.

15 composés identifiés
dont:

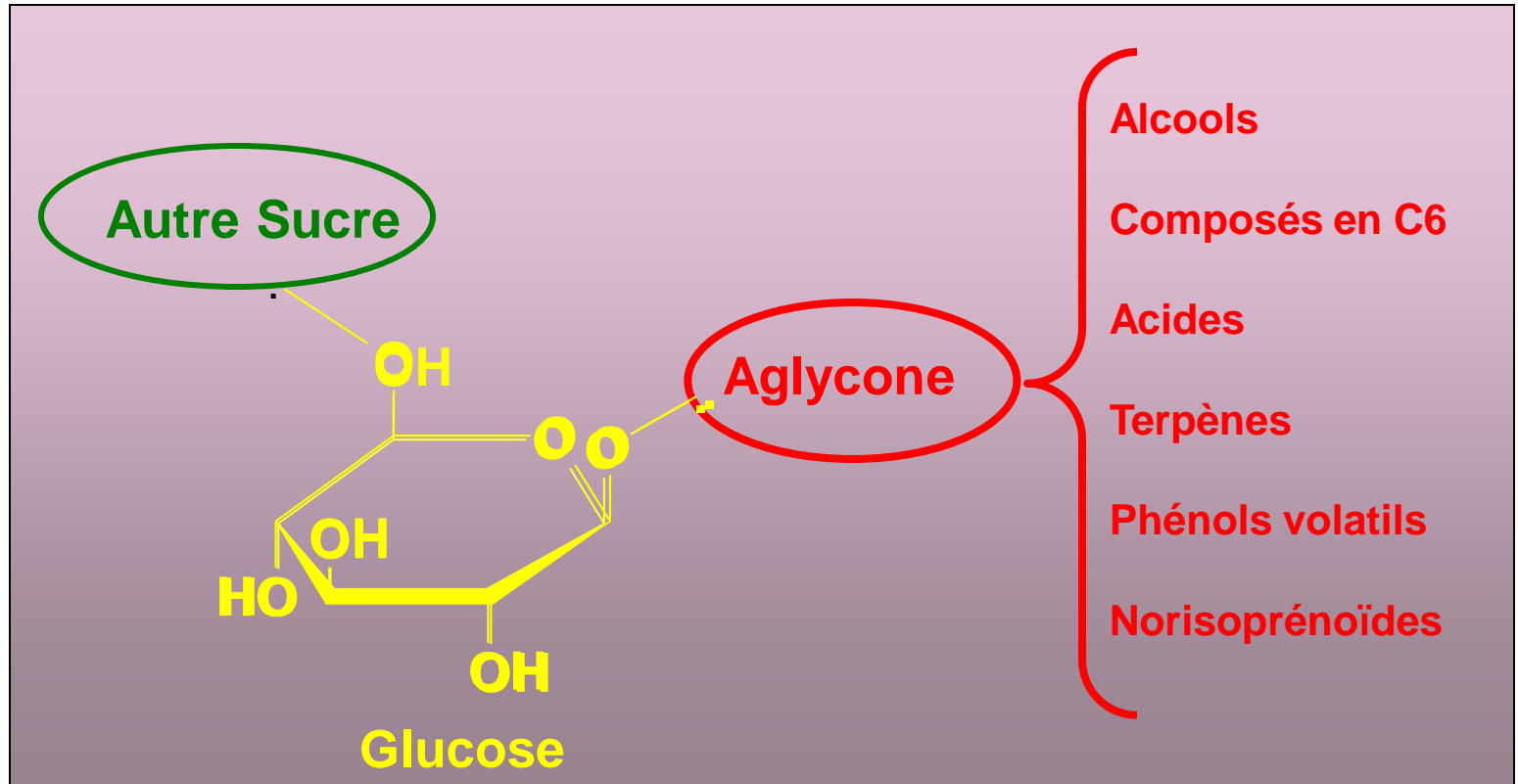
- 1- β -cyclocitral
- 2- linalol
- 3- vitispirane
- 4- terpinèn-4-ol



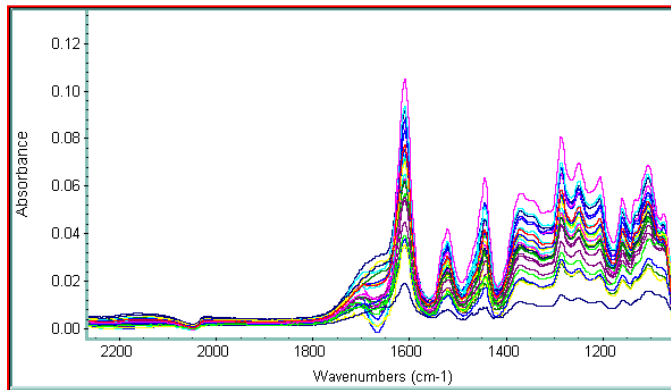
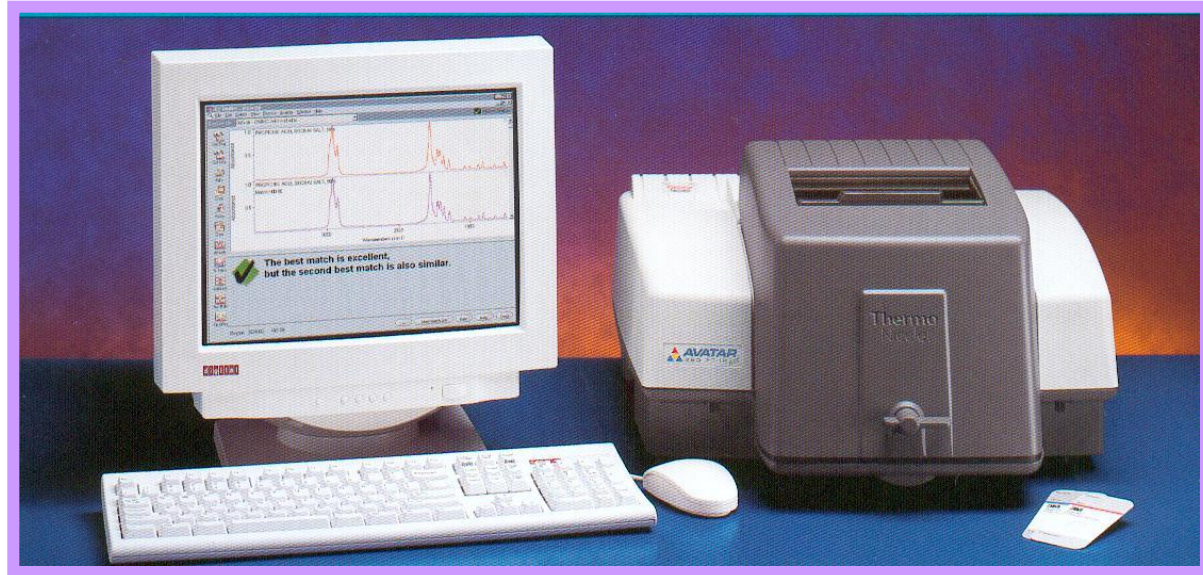
Exemple d'une méthode globale

**Dosage des précurseurs glycosidiques
par IRTF**

GLYCOSIDES DE COMPOSÉS D'ARÔME DU RAISIN



MÉTHODE ITV/INRA



PLS



**données quantitatives issues
des analyses CPG-SM des
aglycones libérés à partir des
extraits glycosidiques**

MÉTHODE ITV/INRA

**Echantillons de raisins
différentes parcelles du vignoble
différents niveaux de maturité**

Traitement des jus au PVPP

**Extraction des glycosides
sur cartouches C18 RP**

**Analyse IRTF
des extraits concentrés**

**Analyse par la méthode
de référence**



CORRÉLATIONS STATISTIQUES

- Calibrations établies pour chaque classe d'aglycones en utilisant en utilisant des régressions PLS (Partial Least Squares).
- Qualité de chaque ajustement PLS évaluée à l'aide
 - du coefficient de corrélation (R)
 - de l'erreur de Prédiction (RMSECV)

Coefficient de corrélation (%)

	Riesling	Gewurz.	Muscadet	Chard.
R² Alcools	78	87	87	60
R² Composés en C₆	36	71	86	98
R² C₁₃-norisoprénoides	84	91	94	90
R² Phénols	88	82	76	33
R² Monoterpènes	87	86	90	87



CORRÉLATIONS STATISTIQUES

Erreur de Prédiction (%)

	Riesling	Gewurz.	Muscadet	Chard.
R² Alcools	28	27	35	32
R² Composés en C₆	11	30	25	12
R² C₁₃-norisoprénoïdes	12	9	14	18
R² Phénols	15	19	23	57
R² Monoterpènes	14	15	15	27



AVANTAGES PRATIQUES

Cette nouvelle méthode

- permet d'analyser 12 échantillons de moûts en 2 jours (vs. 6 jours), plus facilement que la méthode de référence.
- permet une automatisation de l'étape la plus longue, l'extraction des glycosides
- ne requiert qu'un appareil IR-TF, semblable à ceux utilisés en analyses œnologiques classiques
- est adaptable aux vins puisque seuls des extraits glycosidiques sont analysés.



LIMITES

- **Nécessite la constitution préalable d'une banque de données spécifique au cépage considéré.**

disponibles : Muscadet, Riesling Gewurztraminer,
Chardonnay

Grenache et Syrah (dans 1 an)

- **Actualisation régulière de la banque de données**

PERSPECTIVES

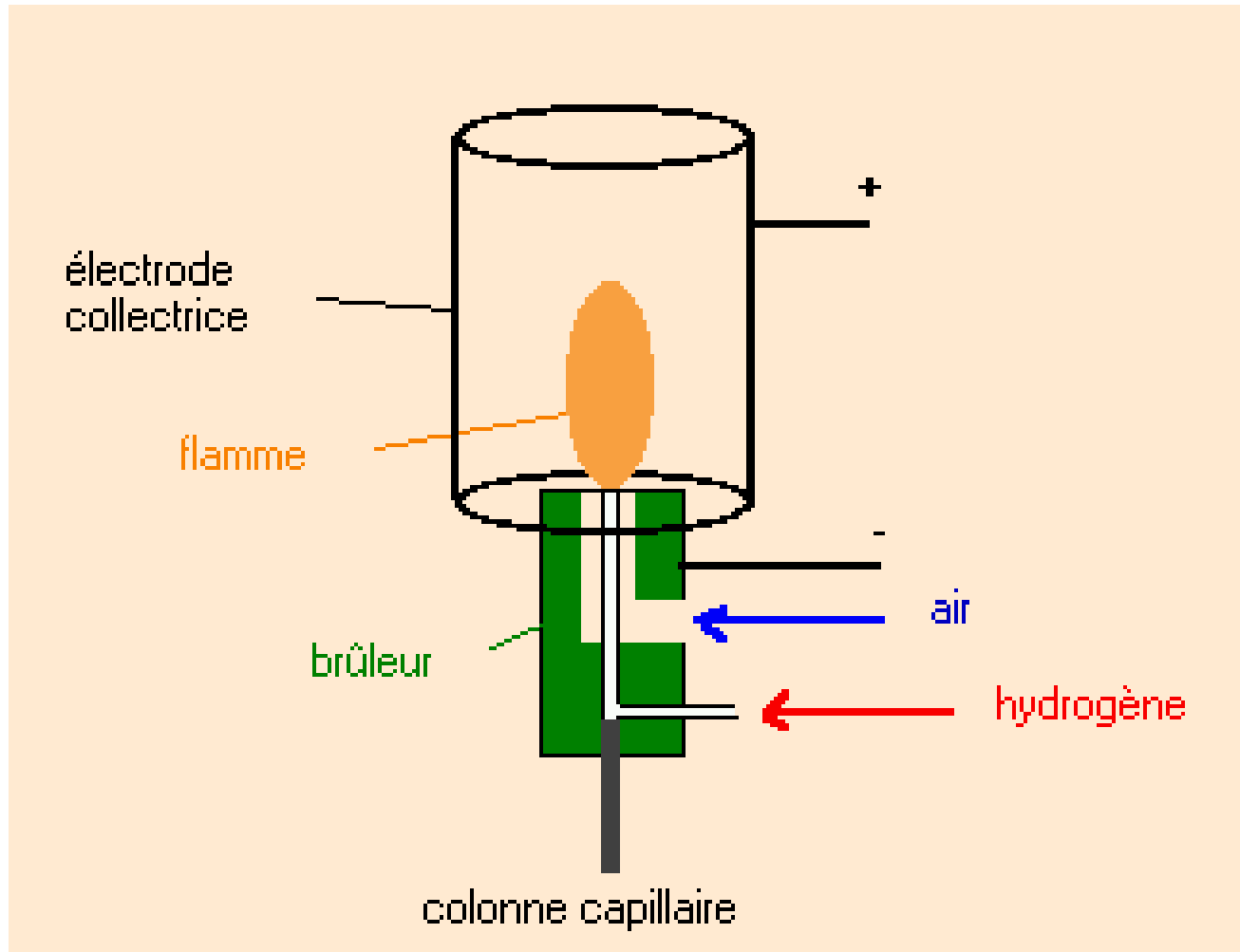
- **Pilotage des itinéraires viti-vinicoles**
- **Aide à la segmentation des produits**



4- Identification et quantification des composés

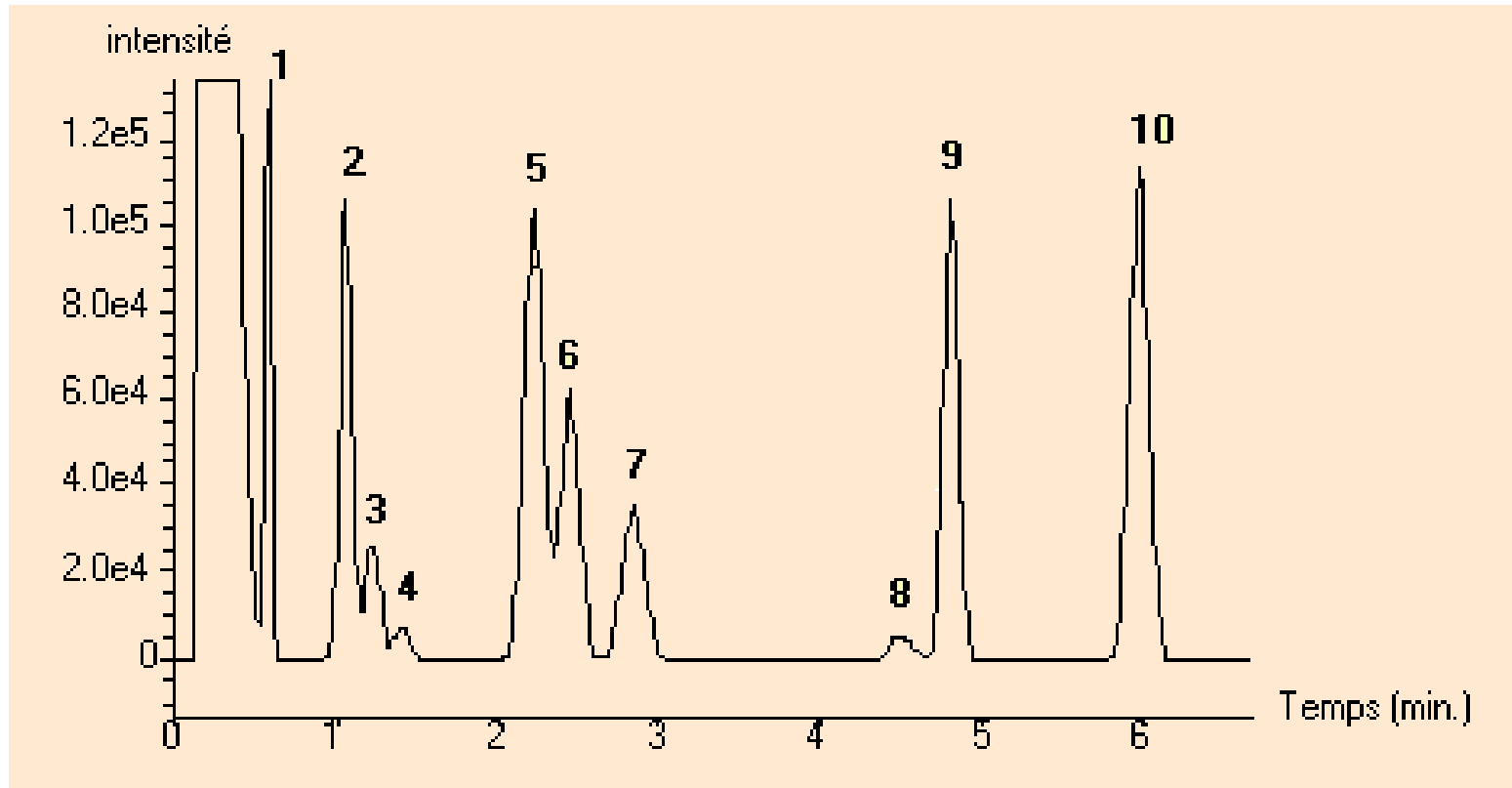
- 4.1- Le détecteur par ionisation de flamme**
- 4.2- La spectrométrie de masse**
- 4.3- Les détecteurs spécifiques : exemple du PFPD
et de l'AED**
- 4.4- Quantification des composés**

Le détecteur par ionisation de flamme



La réponse : le chromatogramme

mVolts



$$[\text{composé 1}] = k * (\text{Aire})_1$$

K dépend du composés et des conditions d'analyse

Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet de déterminer la masse d'une molécule en mesurant son rapport m/z (m : masse de la molécule, z : nb de charge)

Un échantillon à analyser, sous forme gazeuse, est *ionisé*.

Les espèces chargées sont soumises à un champs électrique ou magnétique qui permet de les séparer en fonction du rapport m/z

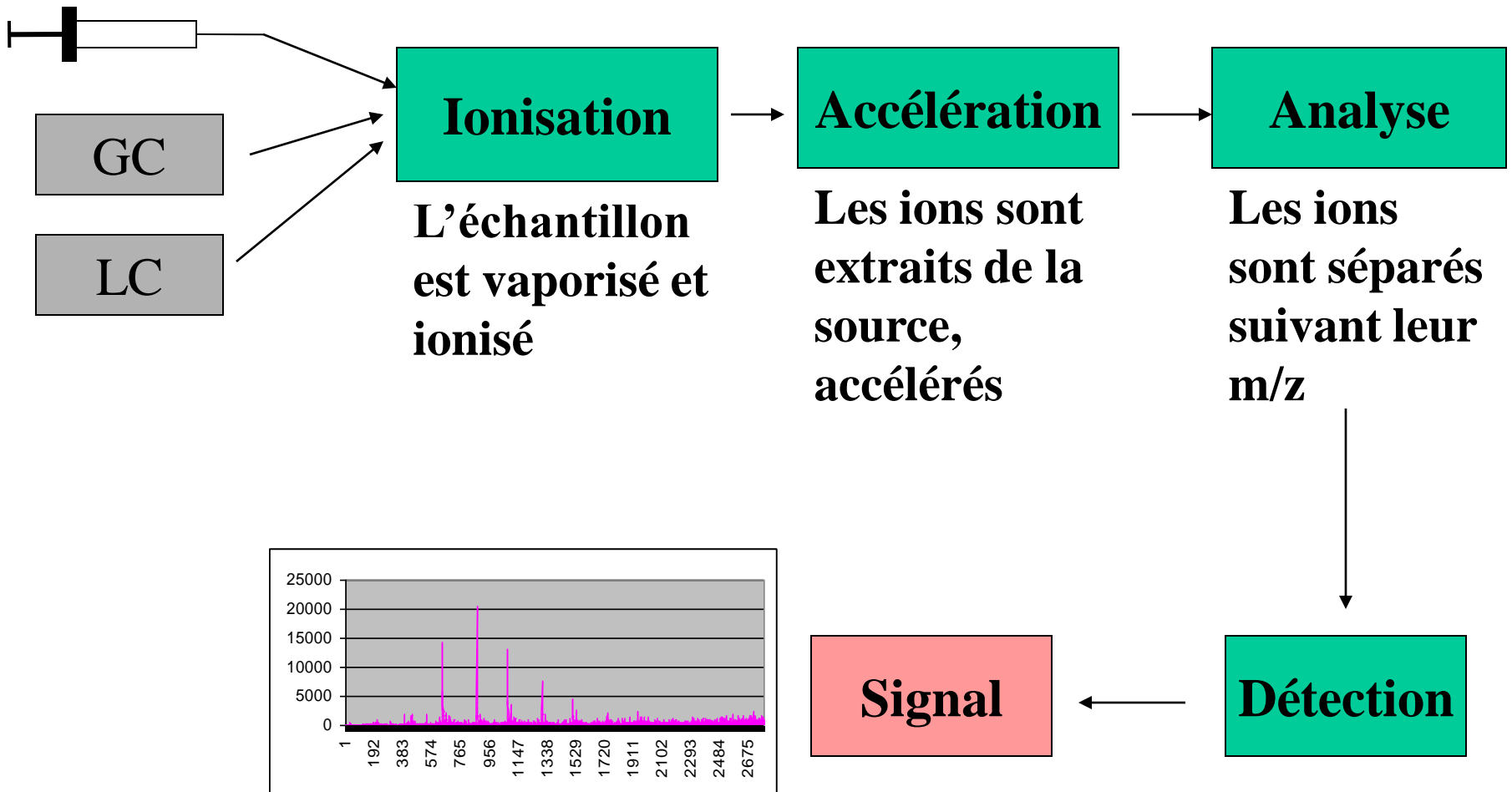
Un peu d'histoire

- **1886 découverte des ions positifs (Goldstein)**
- **1912 : 1er spectres de masse de gaz, ions négatifs, multichargés (JJ Thompson)**
- **1918 : construction d'un secteur magnétique**
- **1948 : TOF**
- **1953 : Quadripôle**
- **1957 : 1er couplage GC-MS**
- **1967 : Ionisation chimique**
- **1980 : Thermospray**
- **1981 : FAB**
- **1984 : Trappe ionique**
- **1985 : MALDI**
- **1988 : Electrospray**

Echantillon : solide, liquide ou gazeux

- **Solide** : introduction directe avec canne : DIP-MS (Direct Insertion Probe)
- **Gazeuse** : après séparation en GC : GC-MS
- **Liquide** :
 - pompe seringue : infusion
 - après séparation en HPLC : LC-MS
 - après séparation par électrophorèse capillaire : CE-MS

Etapes de l'analyse en spectrométrie de masse



Les sources

Le rôle de la source est de désolvater les matrices liquides ou solides, et d'ioniser

2 grandes catégories de procédés d'ionisation :

-Procédés d'ionisation sous vide

Ionisation par impact électronique

Ionisation chimique

FAB

MALDI

-Procédés d'ionisation à pression atmosphérique (API)

ESI

APCI

Ionisation par impact électronique : EI

- Filament incandescent émet des e⁻ qui bombardent les molécules à l'état de vapeur → fragments → ions positifs → spectre

- Si E=10 à 12 eV : ionisation



ion moléculaire

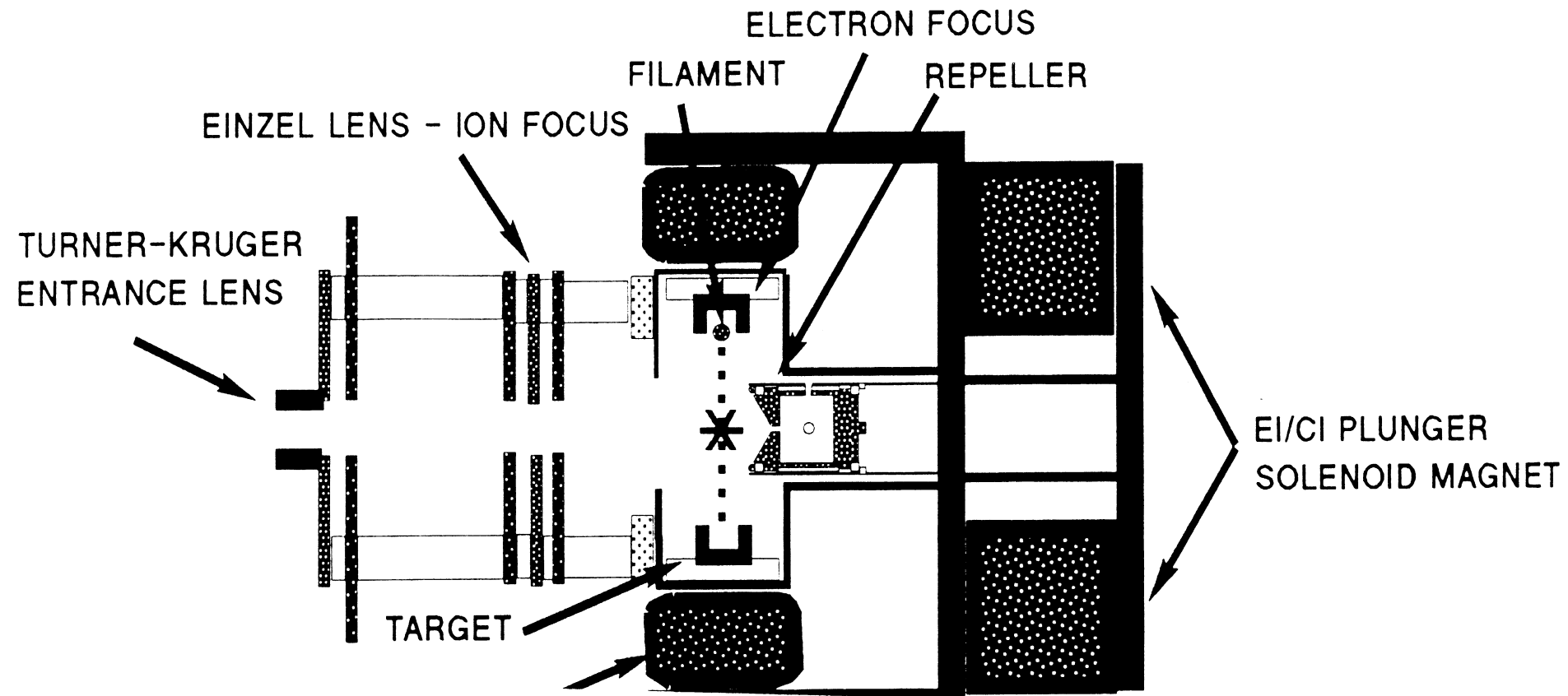
- Si E augmente → cassure des liaisons chimiques



ion fragment

- Par convention enregistrement des spectres à 70eV

IMPACT ELECTRONIQUE : schéma



Ionisation chimique : CI

- soit gazeuse soit liquide
- Gaz dans la source : plasma de gaz réactant
moins de collision entre e^- et composés
→ moins de fragmentation

Gazeuse:

NH₃

CH₄

isobutane

...

Liquide:

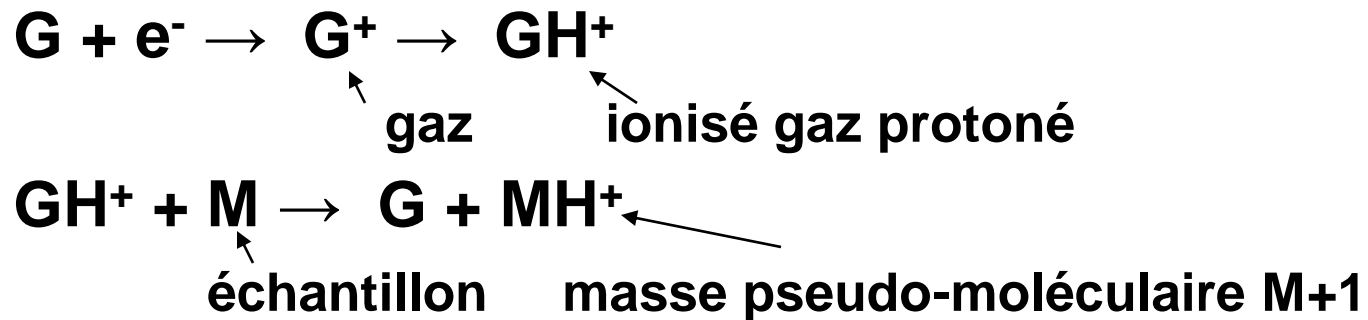
acétonitrile

méthanol

...

Ionisation chimique : CI

- soit positive (PCI) soit négative (NCI)
- PCI : réaction de protonation



- NCI : capture d'électrons



Transfert des ions

But :

- transfert des ions de la source vers l'analyseur
- Accélération (vitesse d'un ion fonction de m , z et tension)
- Elimination des neutres, tri

- Ex : ion monochargé, 1000 Da, ddp 8kV, atteint une vitesse de 40km/s

- Utilisation d'octapoles (ou hexapole), lentilles électroniques

Les analyseurs

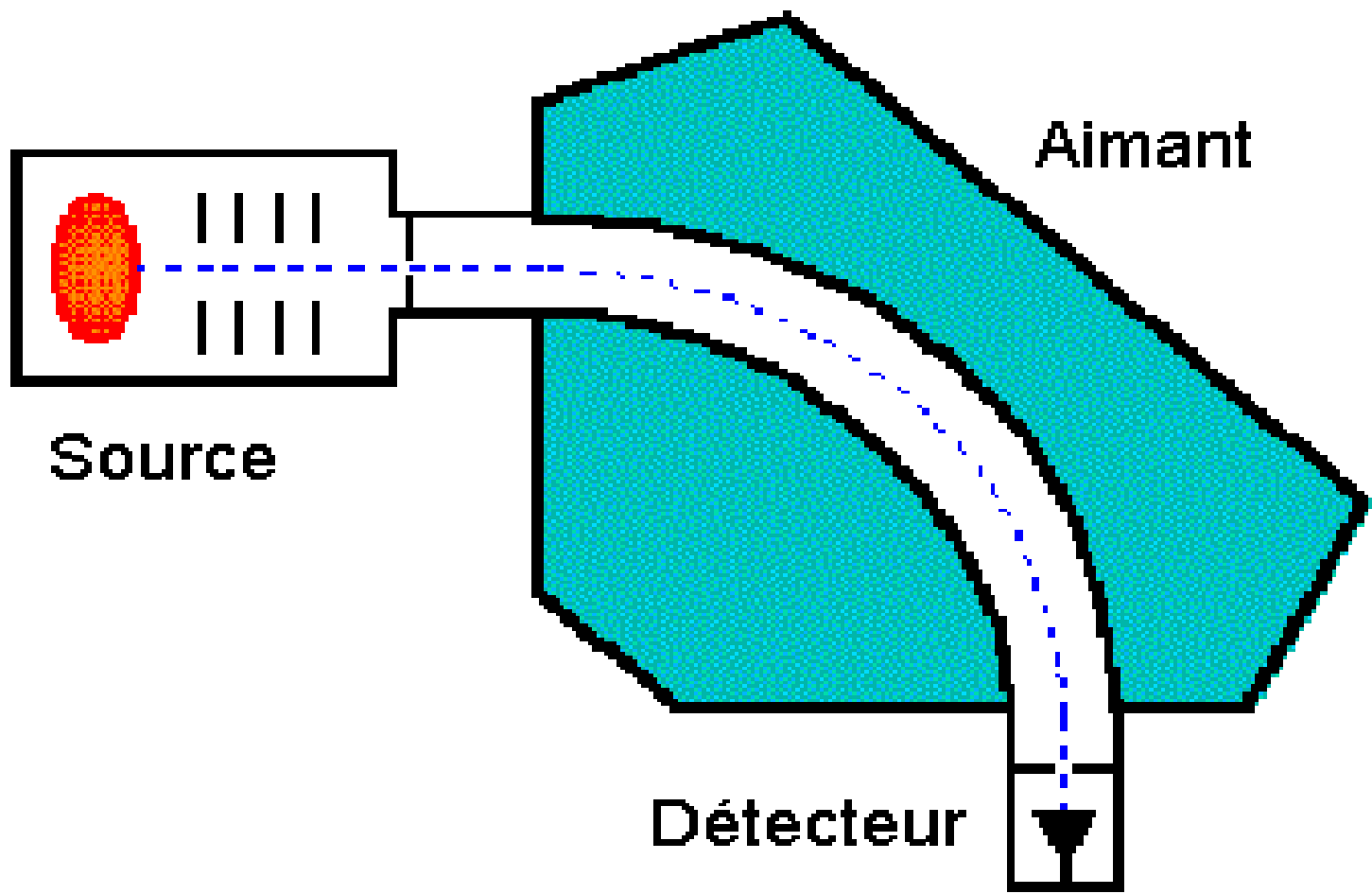
Quelques analyseurs :

- **Secteur magnétique**
- **Quadripôle**
- **Trappe ionique**
- **TOF**

Secteur magnétique : principe

- Une molécule chargée est déviée dans un champs magnétique
- Une tension appliquée à l'électro-aimant correspond à un rapport m/z
- Les ions de rapport m/z supérieur ne sont pas assez déviés, les ions de m/z inférieur sont trop déviés

Secteur magnétique : schéma



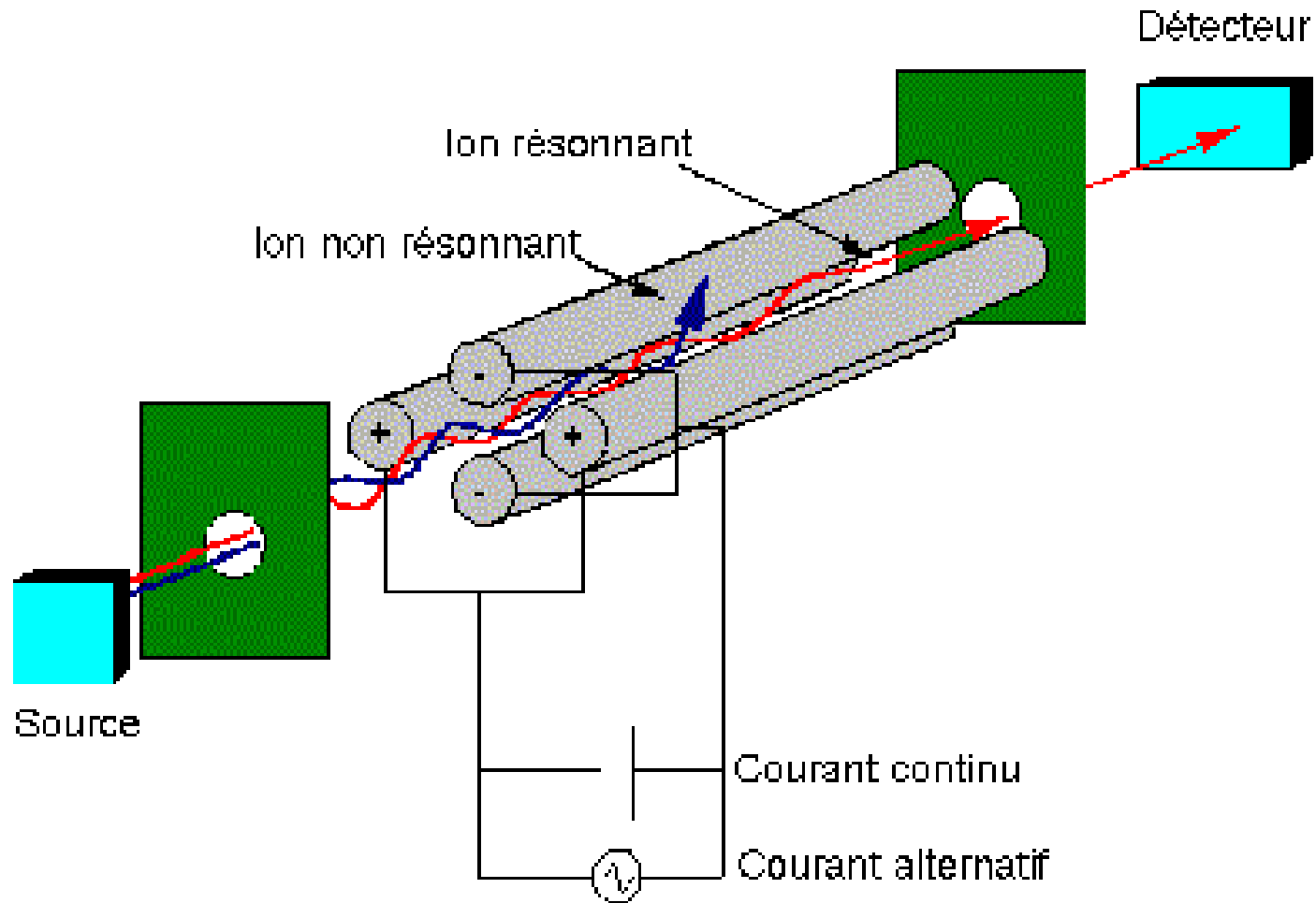
QUADRIPÔLE : Principe

- Toujours associé à une source externe
- Quadripôle = filtre
- Constitué de 4 barreaux métalliques hyperboliques ou cylindriques parallèles et équidistants
- -2 électrodes opposées portées à un potentiel $U+V\cos\omega t$
- -les 2 autres au même potentiel mais de signes opposés $-(U+V\cos\omega t)$
- U : composante de tension continue
- $V\cos\omega t$: composante de tension alternative
- V : amplitude
- ω : pulsation 1.2MHz
- application de ces potentiels \Rightarrow champs quadripolaires entre les électrodes

QUADRIPÔLE : Principe

- A la sortie de la source après accélération les ions entrent dans l'analyseur suivant l'axe z
- Sous l'effet du champs quadripolaire \mathcal{Q} mouvement hélicoïdal dont l'amplitude en x et y dépend de U et V
- L'ion pourra atteindre le détecteur si amplitude de sa trajectoire en x et y est inférieure à la distance entre les électrodes
- Pour un ion de m/z donné, un seul couple de valeur U et V déterminé
- Balayage en U/V on augmente simultanément U et V (U/V=cste)
- Chaque m/z formé a une trajectoire stable lui permettant d'atteindre le détecteur

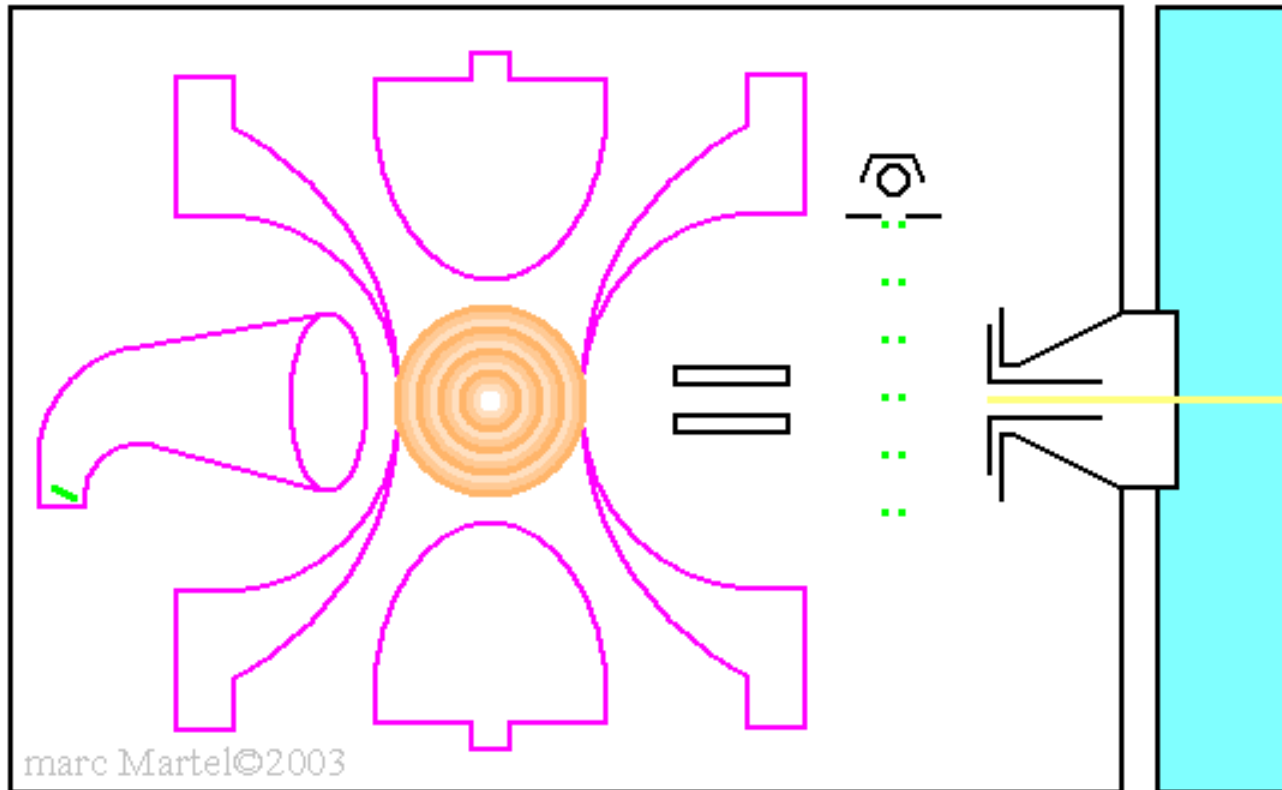
Quadripôle : schéma



Principe de la trappe ionique

- **Présence d'un champ électrique entre les 3 électrodes**
- **Les ions suivent une trajectoire en 8 (courbe de Lissajou) au centre de la trappe**
- **En modifiant l'amplitude de la radiofréquence, certains ions sont déstabilisés et expulsés de la trappe, vers le détecteur ou la poubelle**

Schéma de la trappe ionique



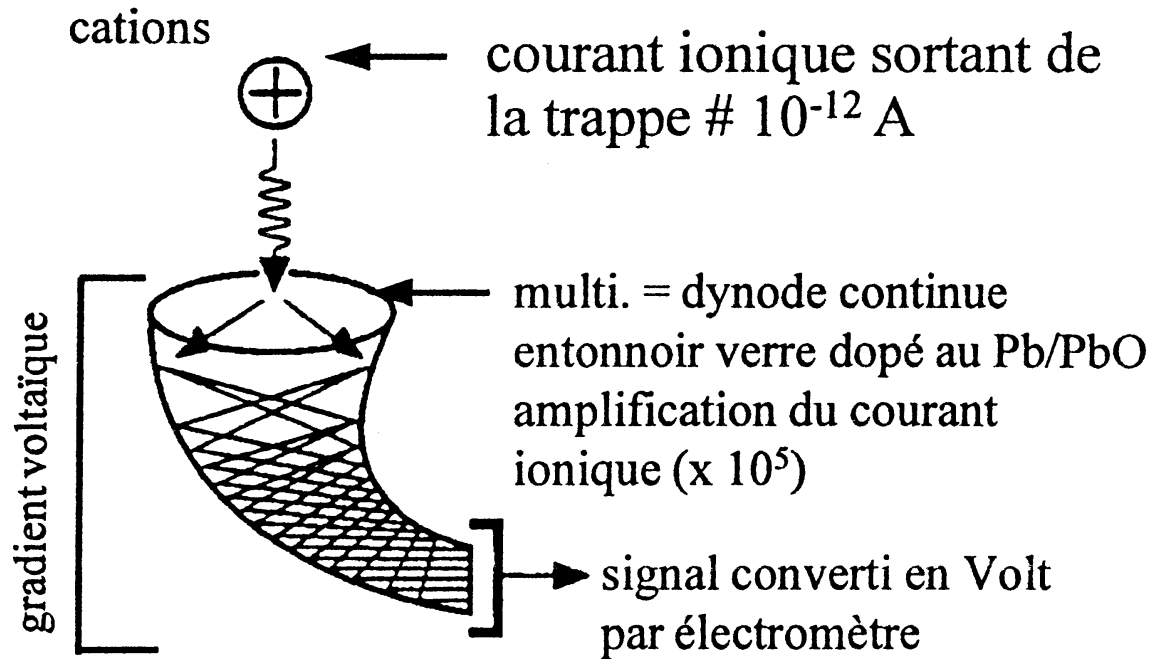
TOF : Principe

- Les ions sont accélérés et atteignent une vitesse v
- Ils sont envoyés dans un « tube de vol » ($L=1-3\text{ m}$)
- Le temps t mis pour parcourir L permet de déterminer le rapport m/z
- $(1/2)mv^2=qU$ et $L=vt$ donc $m/q=(2U/L^2)t^2$

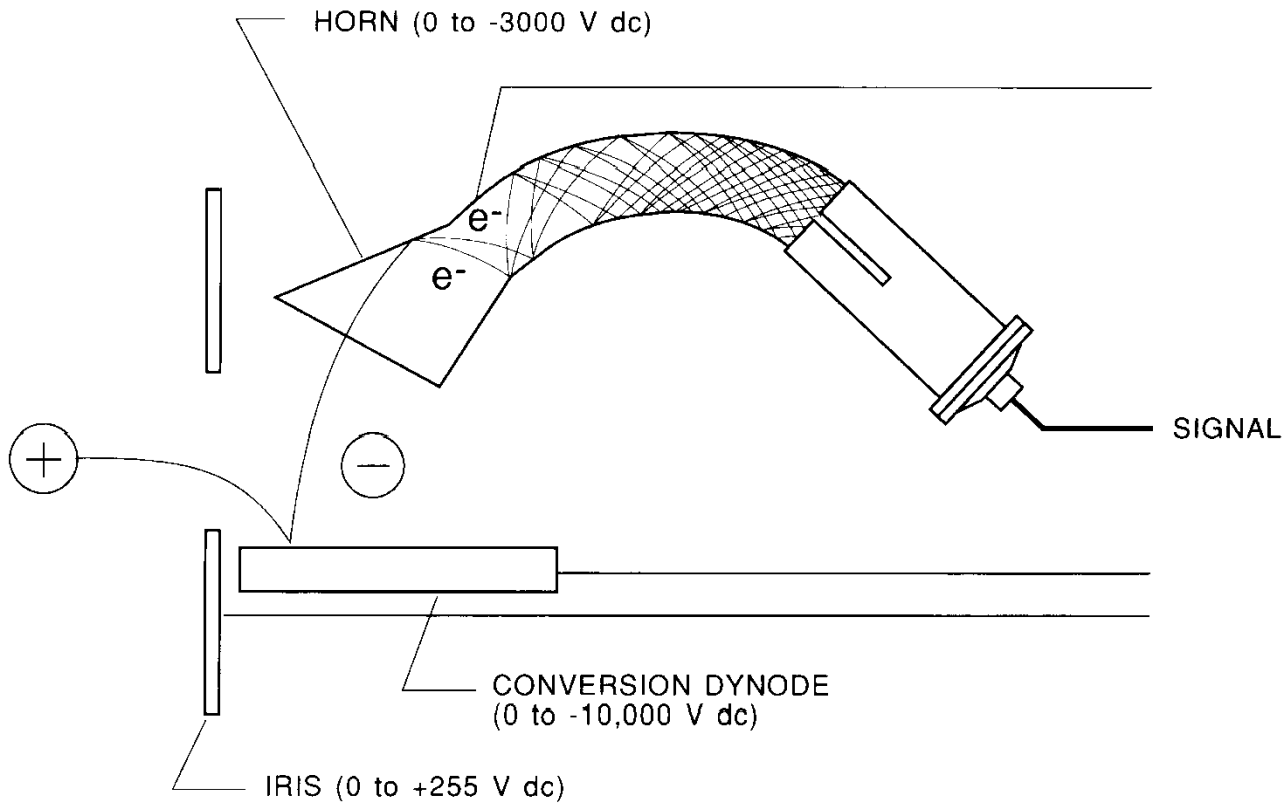
DETECTEUR : Principe

- **But : Transformation d'un courant ionique faible (10^{-12} A) en un signal électrique mesurable**
- **Utilisation de channeltron , HED (High Energy Dynode)**
 - ↳ gain de 10^5 à 10^6
- **Channeltron : Détecteur à dinode continue, intérieur recouvert**
 - d'une couche d'oxyde de plomb
- **HED : +haute énergie sur la dinode**
 - ↳ gain de sensibilité sur les hautes masses

Multiplicateur d'électrons à dynode continue



HED : Hight Energy Dynode



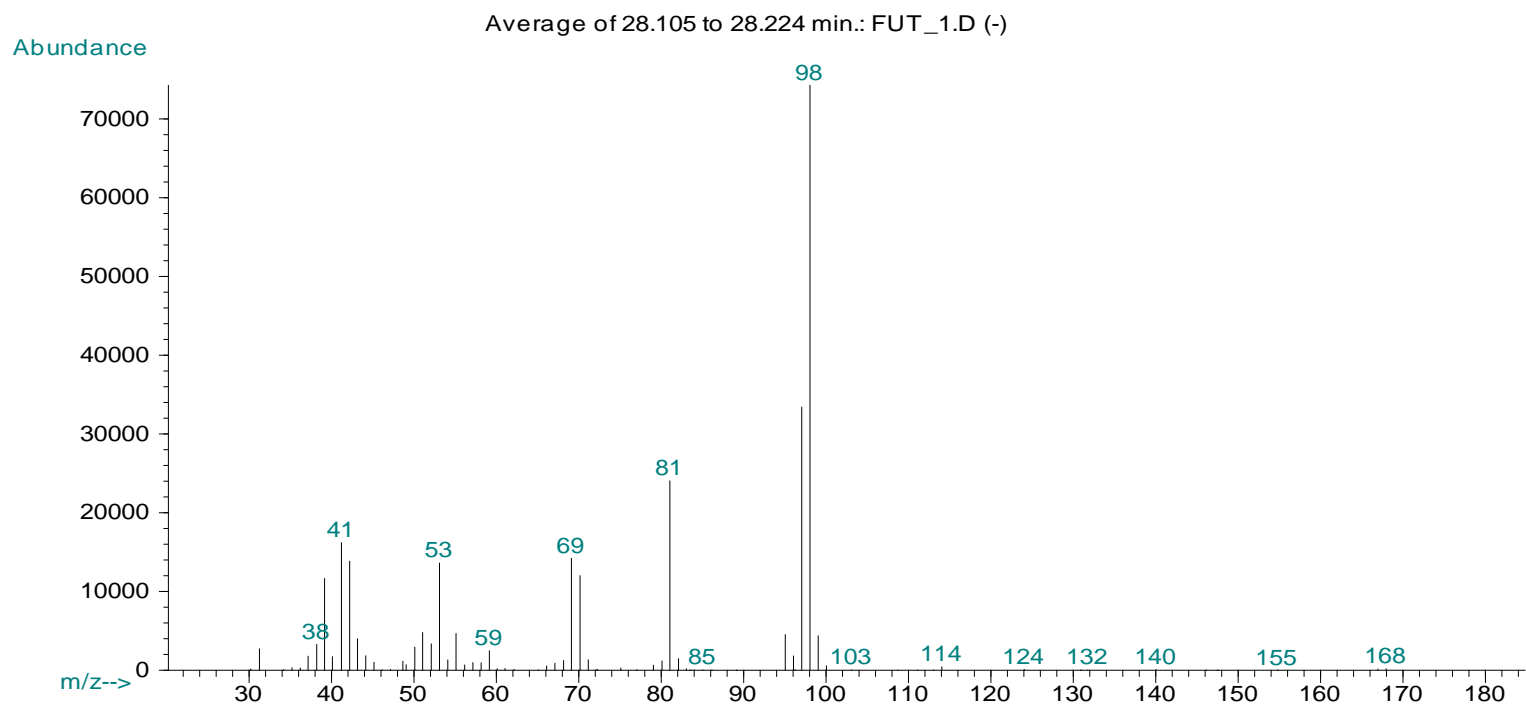
Modes d'acquisition

- **Fullscan** : balayage sur une large gamme de m/z
ex: de 29 à 350 avec un scan/seconde
- **Acquisitions sélectives** : SIM-SIR-SIS
 - SIM** : Single Ion Monitoring
 - SIR** : Single Ion Recording
 - SIS** : Single Ion Storage
- Ne détecte que un ou quelques ions
→ augmentation de la sensibilité

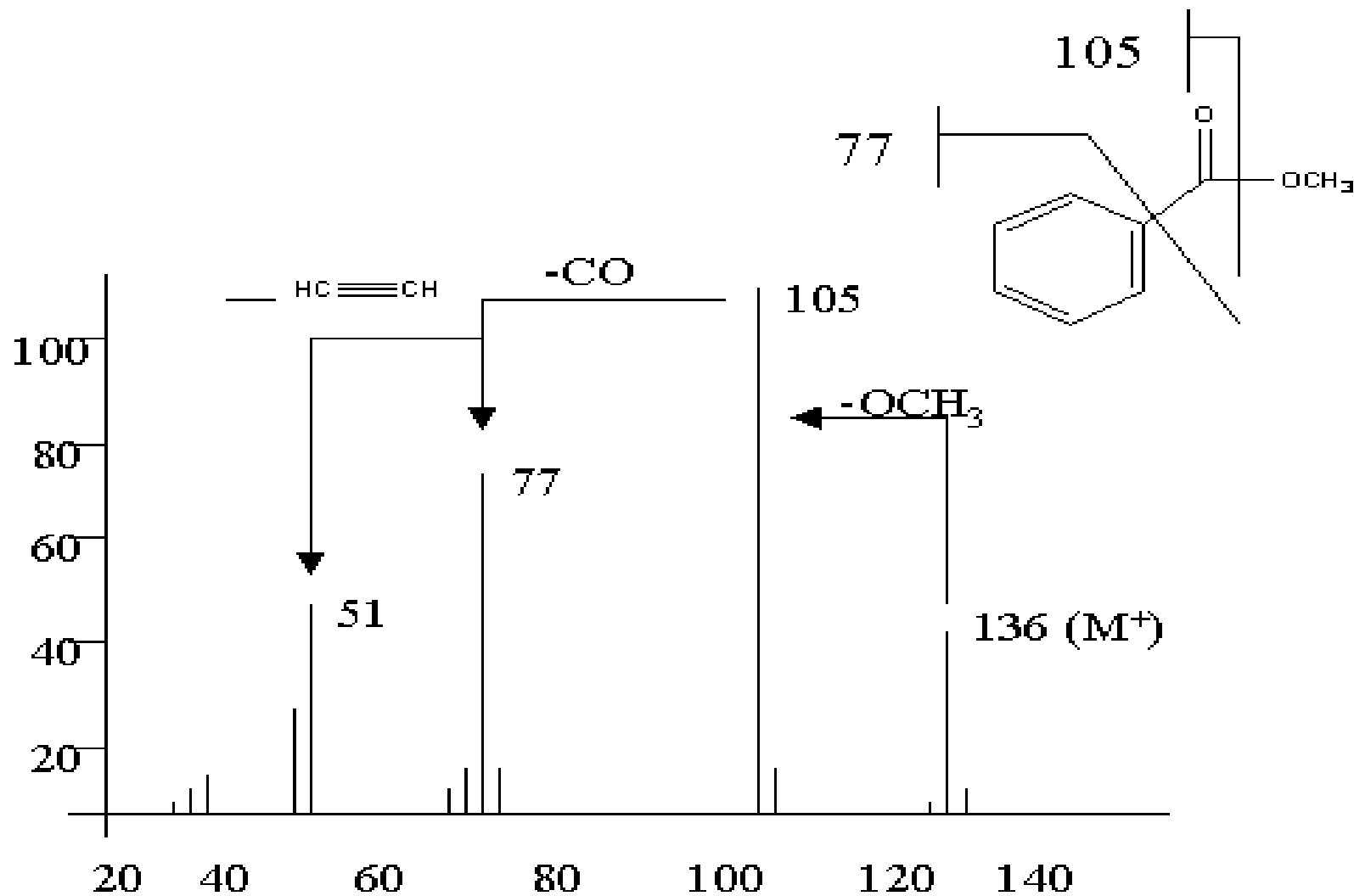
Définitions

- **Extraction d'ions** : un ou plusieurs m/z différents à partir d'un fullscan
- **TIC** : Total Ionic Current
Total ion chromatograph
- **S/N** : Rapport signal sur bruit

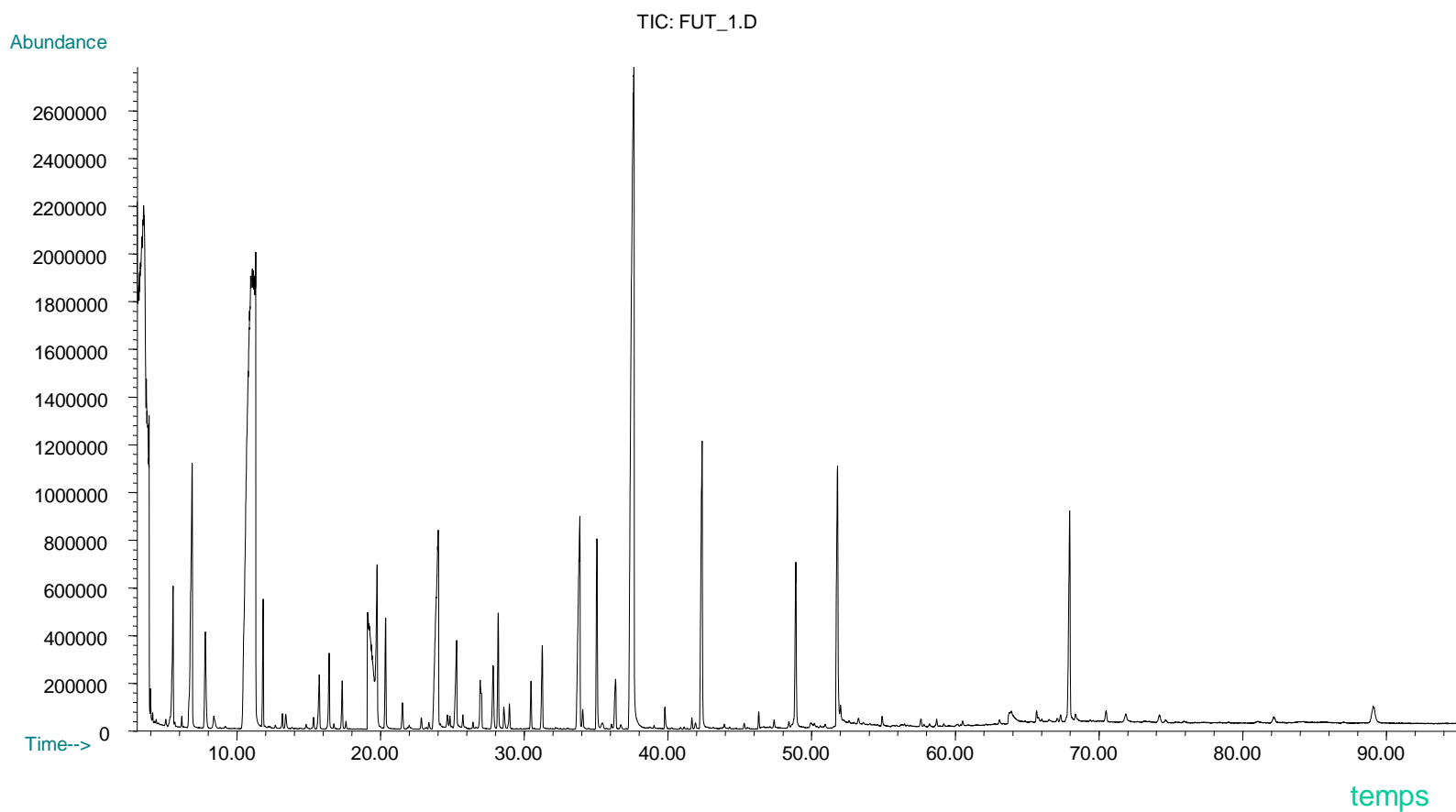
Spectre de masse



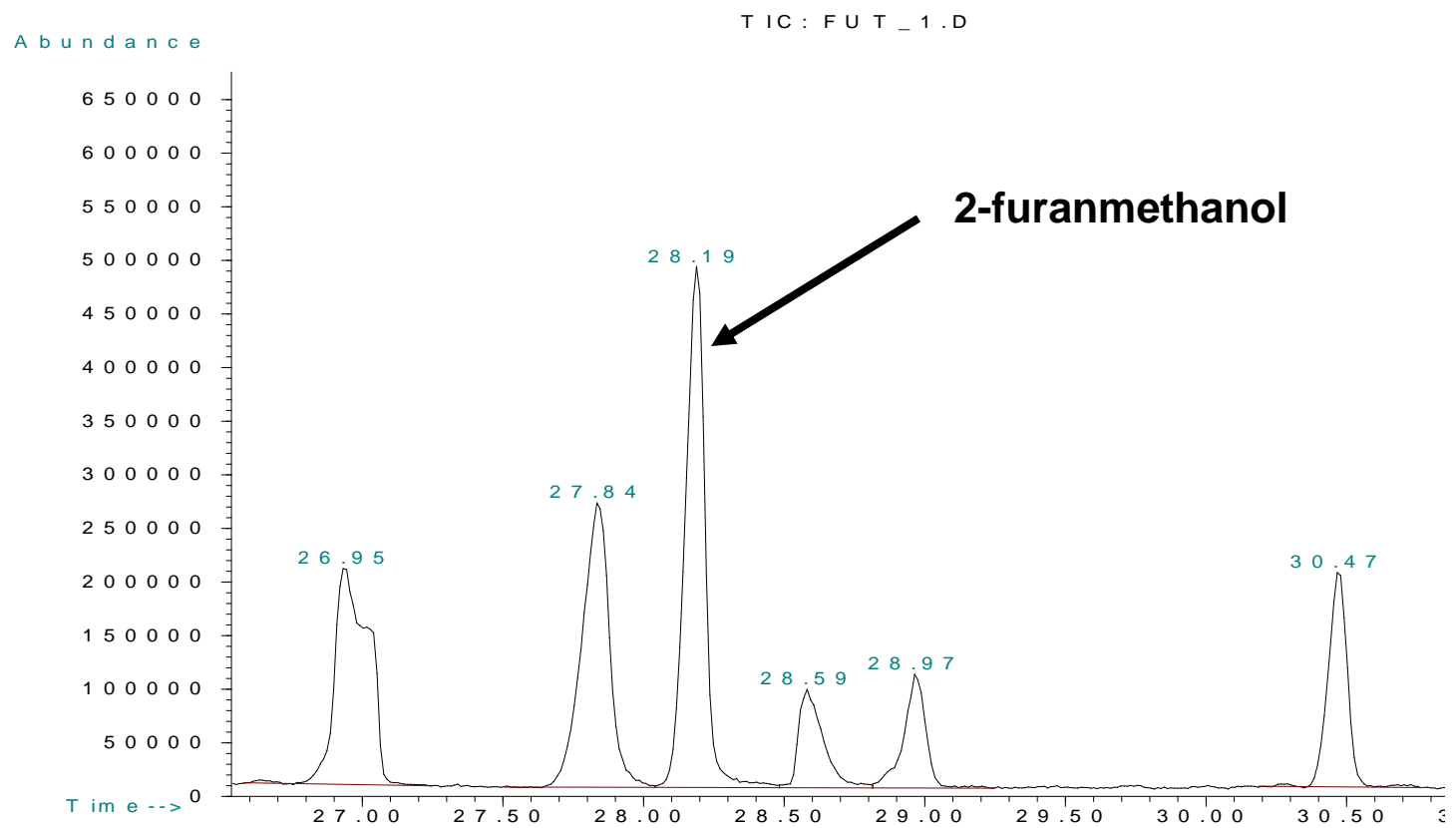
Exemple de fragmentation



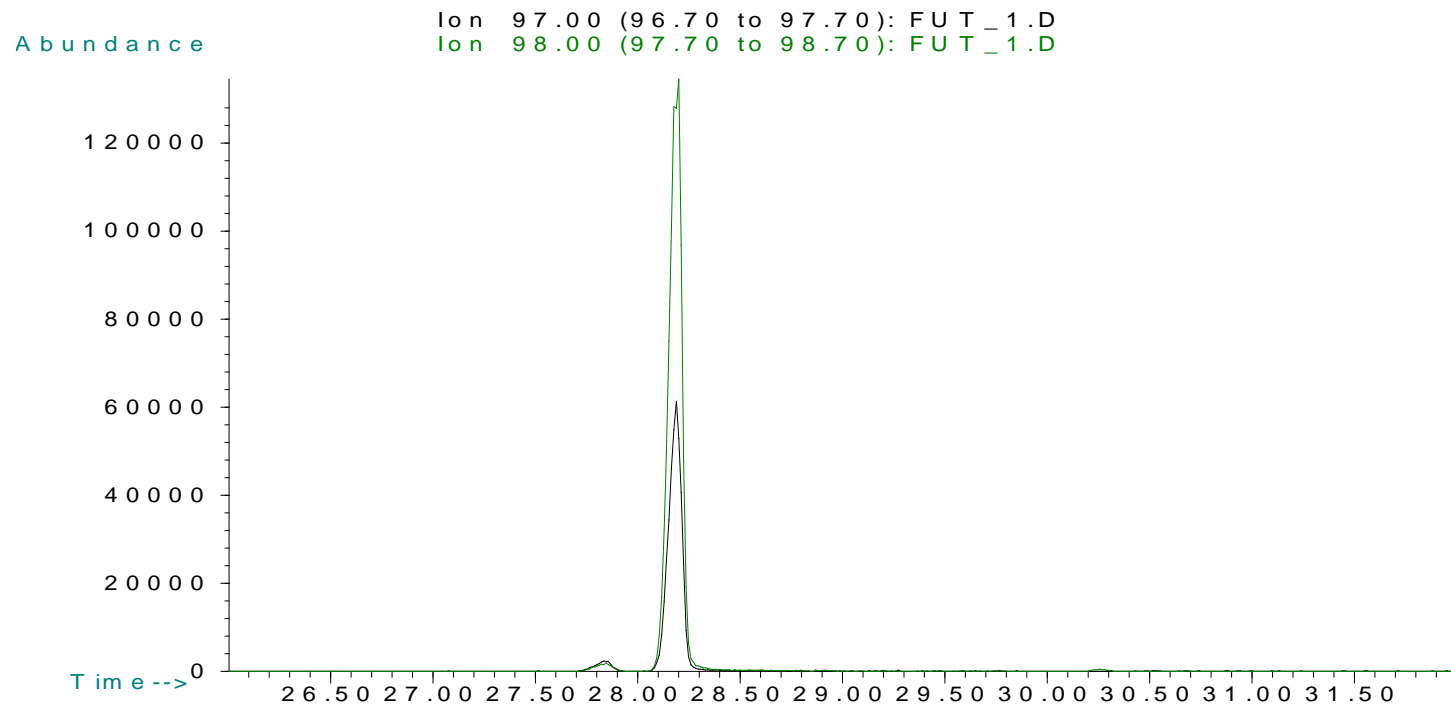
TIC en fullscan



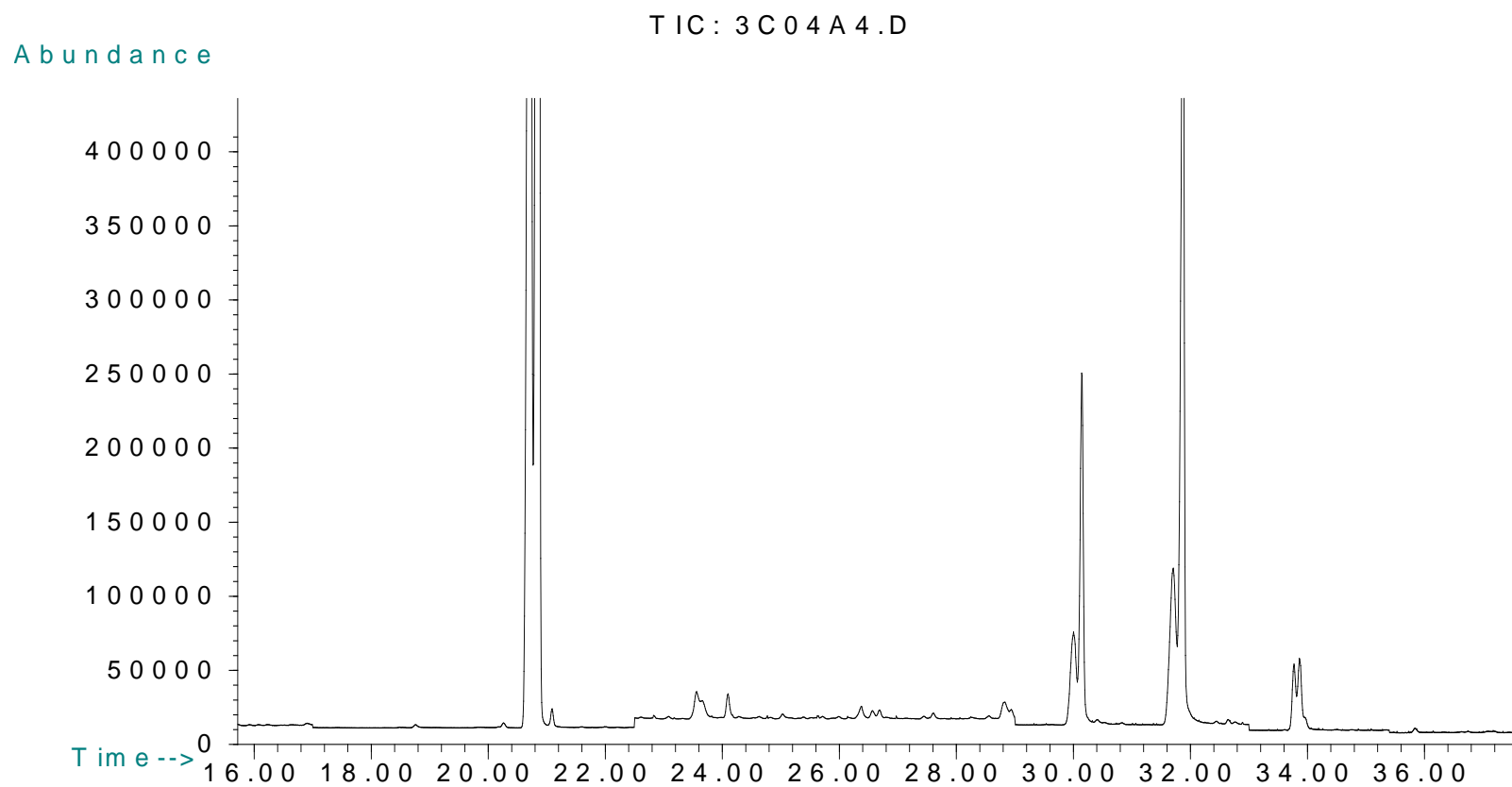
TIC Zoomé



Extraction d'ions

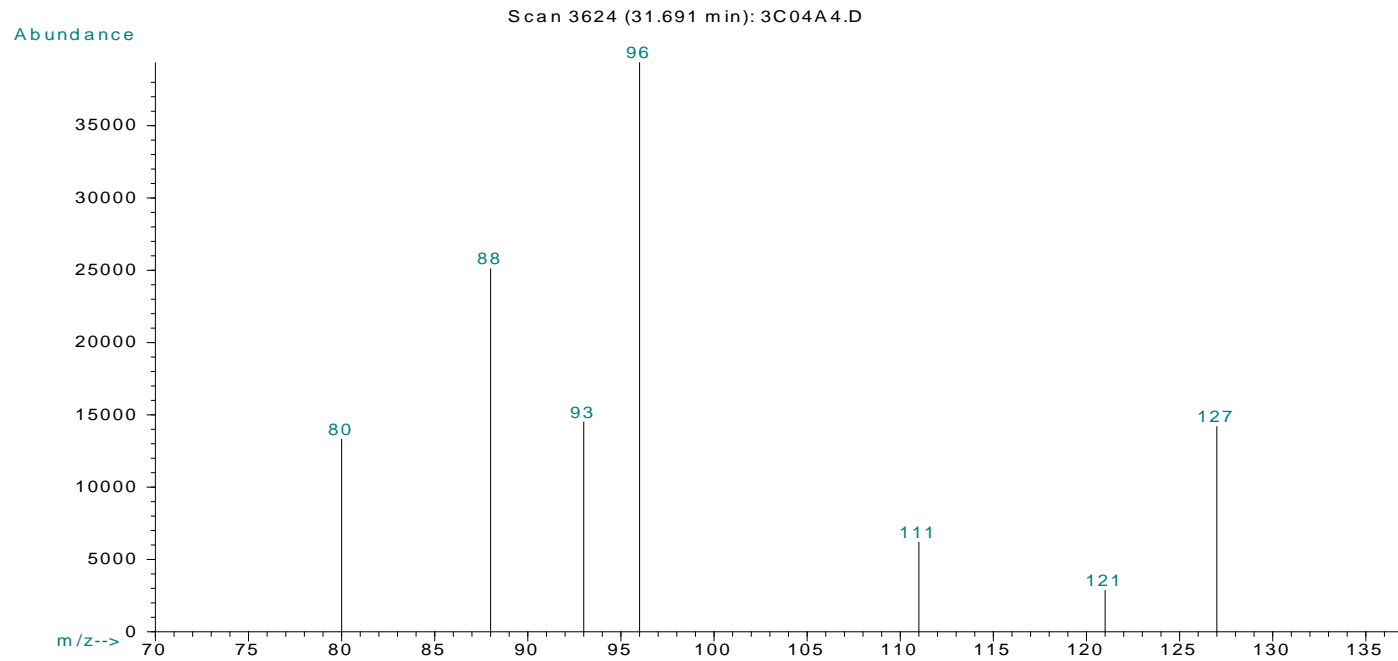


TIC en SIM

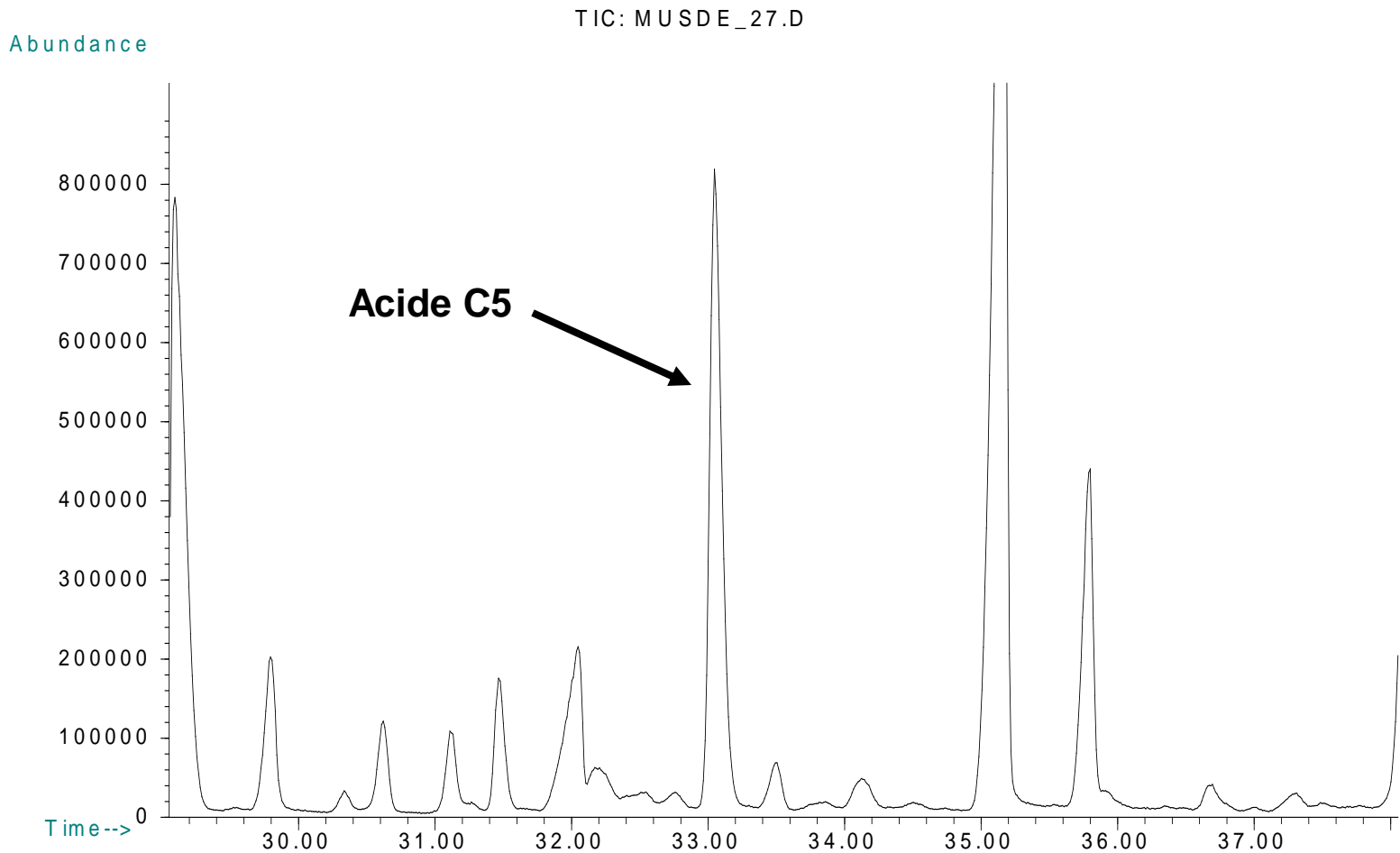


Terpénols naturels et deutérés

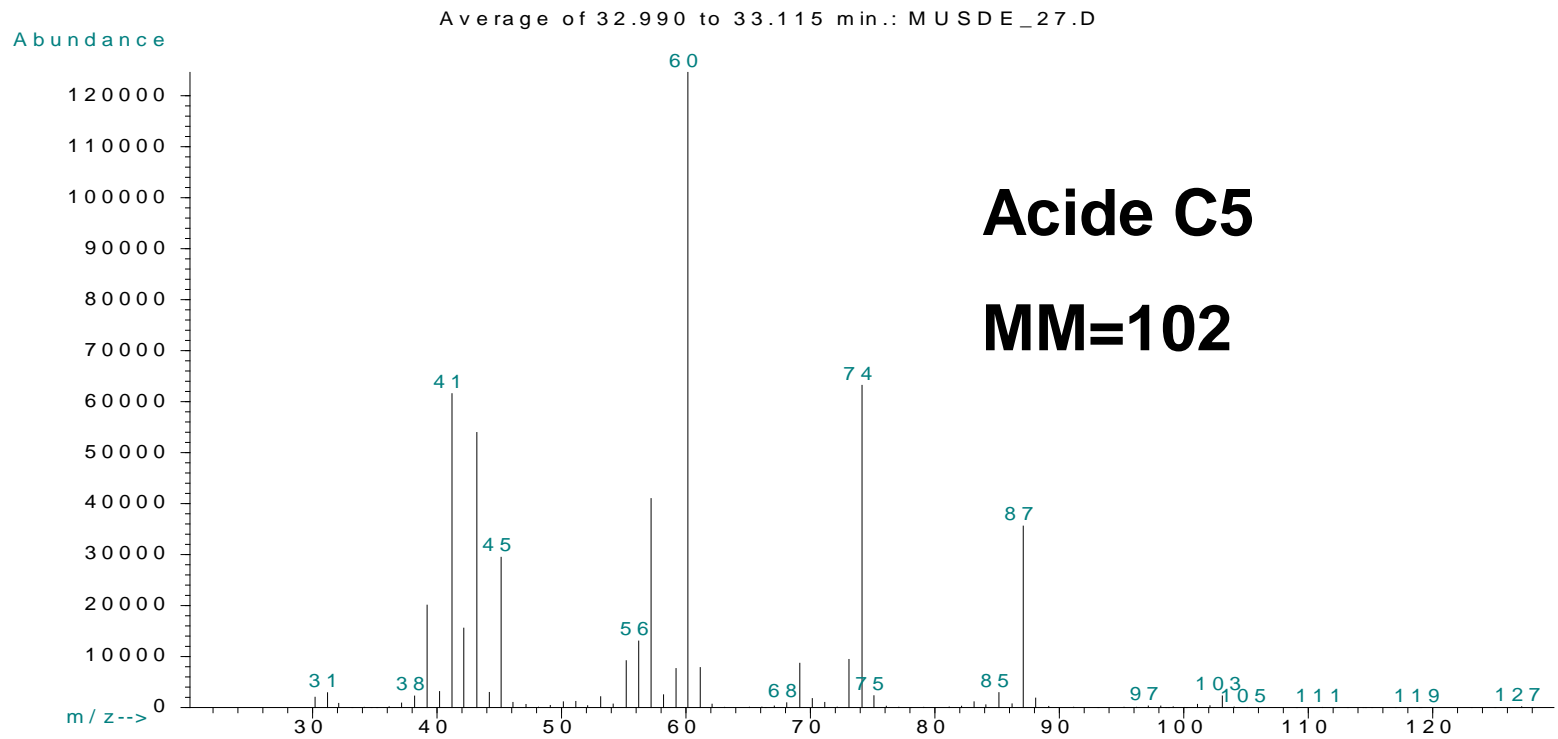
Spectre en SIM



Comparaison EI-PCI : TIC en EI



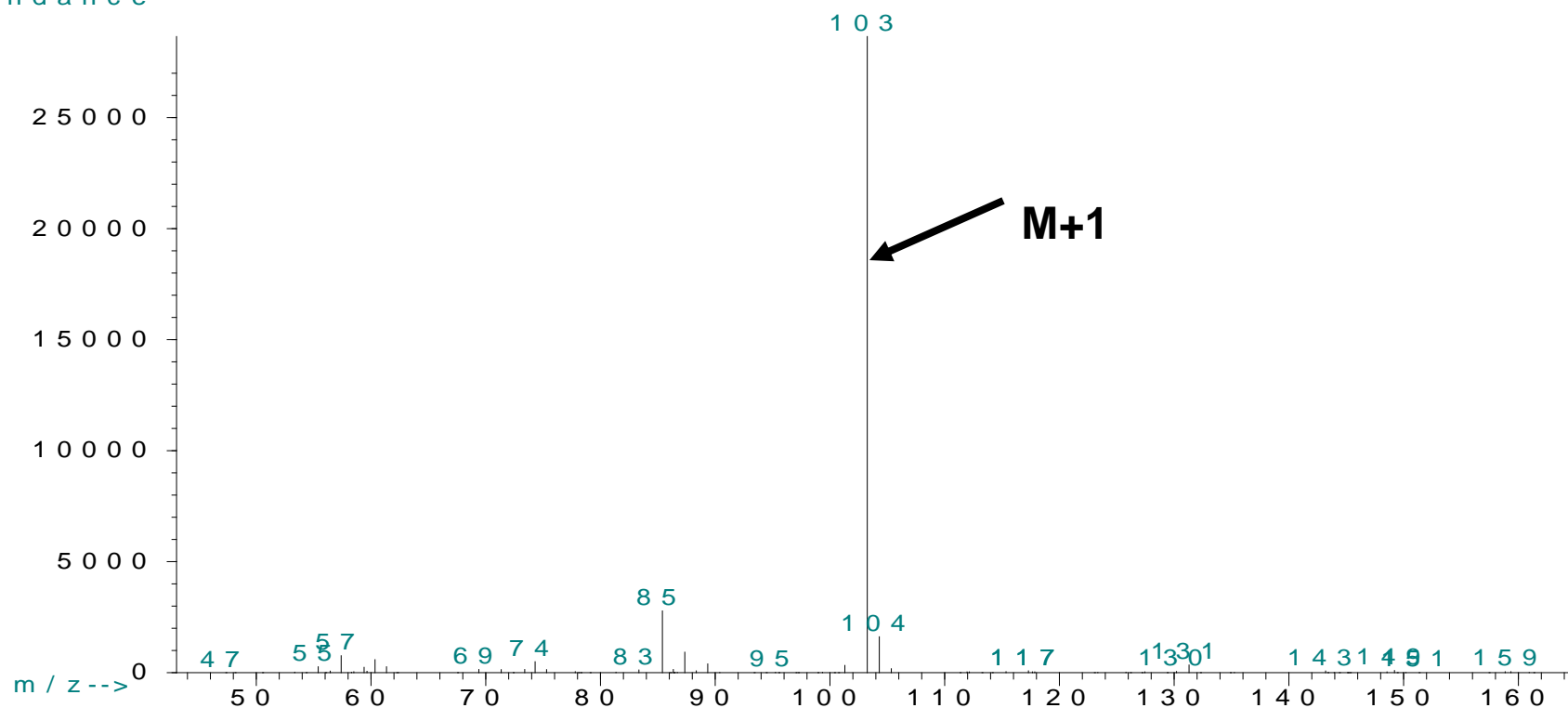
Comparaison EI-PCI : spectre EI



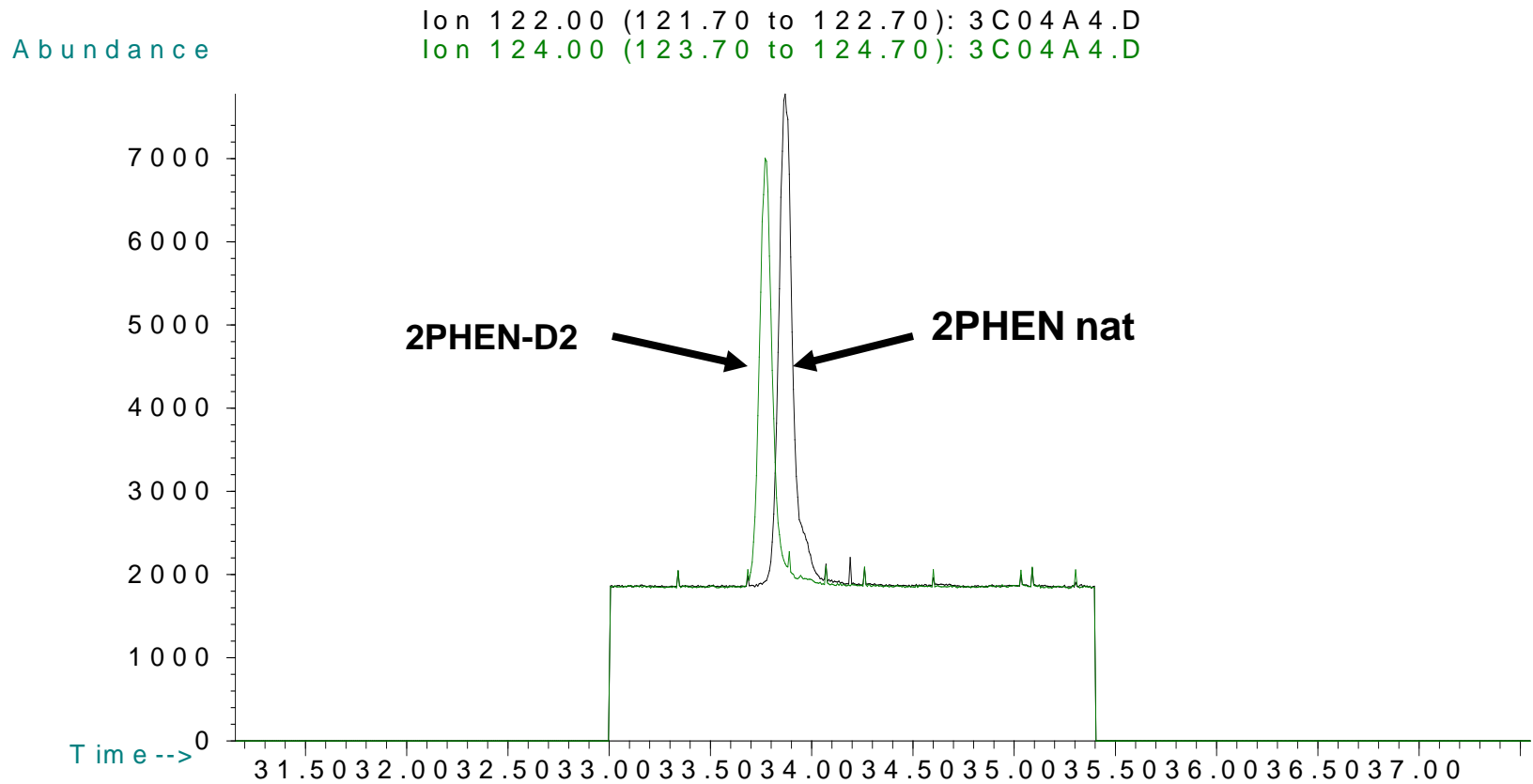
Comparaison EI-PCI : spectre PCI

Average of 32.968 to 33.097 min.: PCISM_5.D

Abundance



Extraction d'ions en SIM

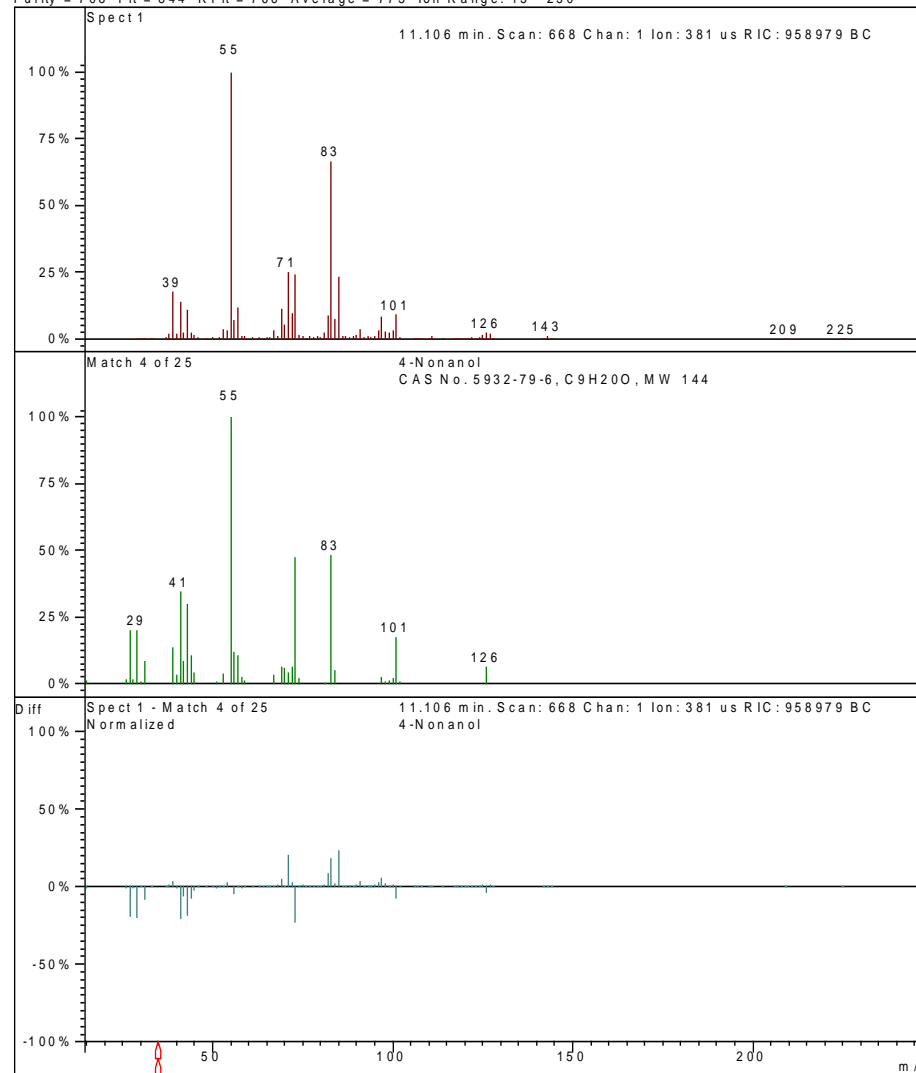


Recherche en bibliothèque

Scan 668 from c:\saturnws\data\sol3_2_furnat_d6 1.sms

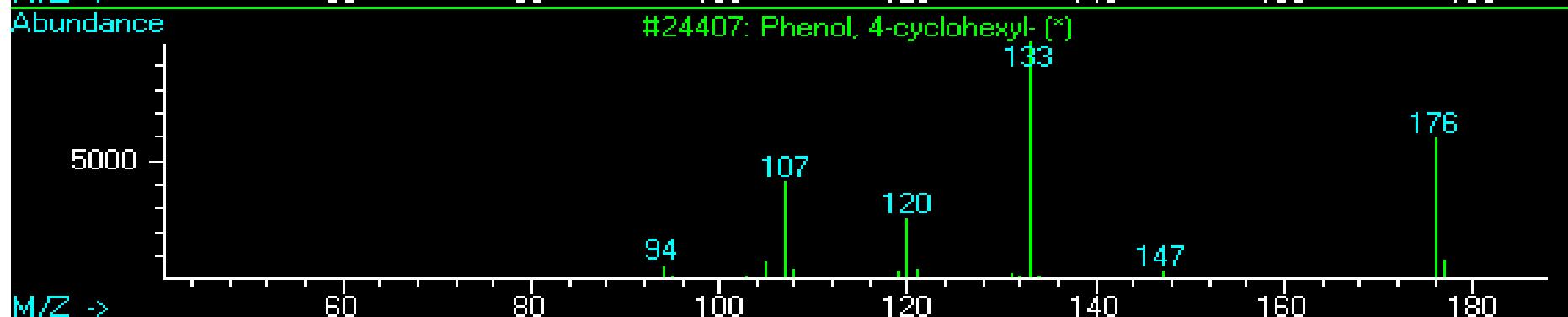
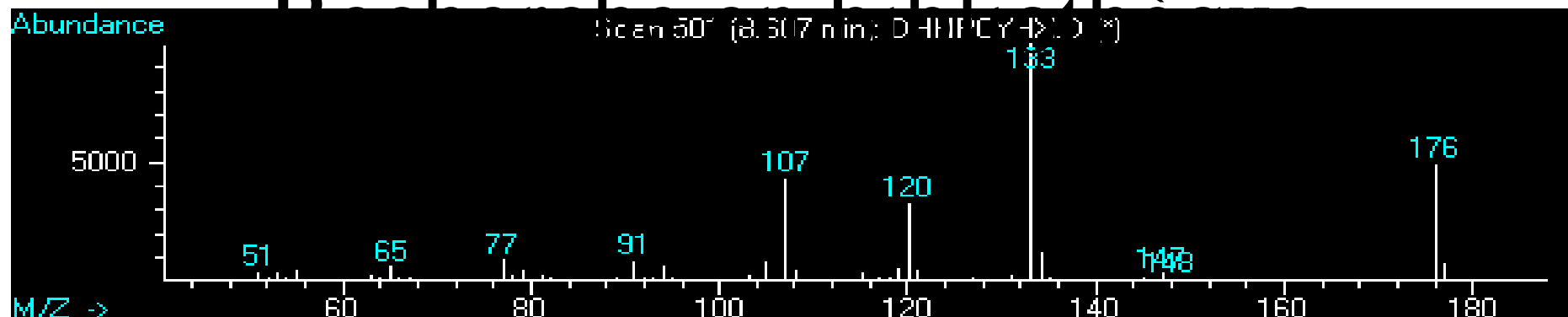
Entry 14316 from nist98m.lbr Saturn Library

Purity = 708 Fit = 844 R Fit = 766 Average = 773 Ion Range: 15 - 250



Recherche en bibliothèque

PBM Graphics Results: wiley.L



Name	Ref No.	MW	Qual
1. Phenol, 4-cyclohexyl-	#24407	176	95
2. Phenol, 2-cyclohexyl-	#122344	176	50
3. 1-PROPANOL, 3-(2,4,6-TRIMETHYLPHENYL)-	#25283	178	35
4. Benzene, 1,4-dipropyl-	#18496	162	17
5. BENZENE, 1,3,5-TRIMETHYL-2-PROPYL-	#18534	162	17
6. Disiloxane, ethenylpentamethyl-	#23279	174	17

Include spectral difference

Show Match

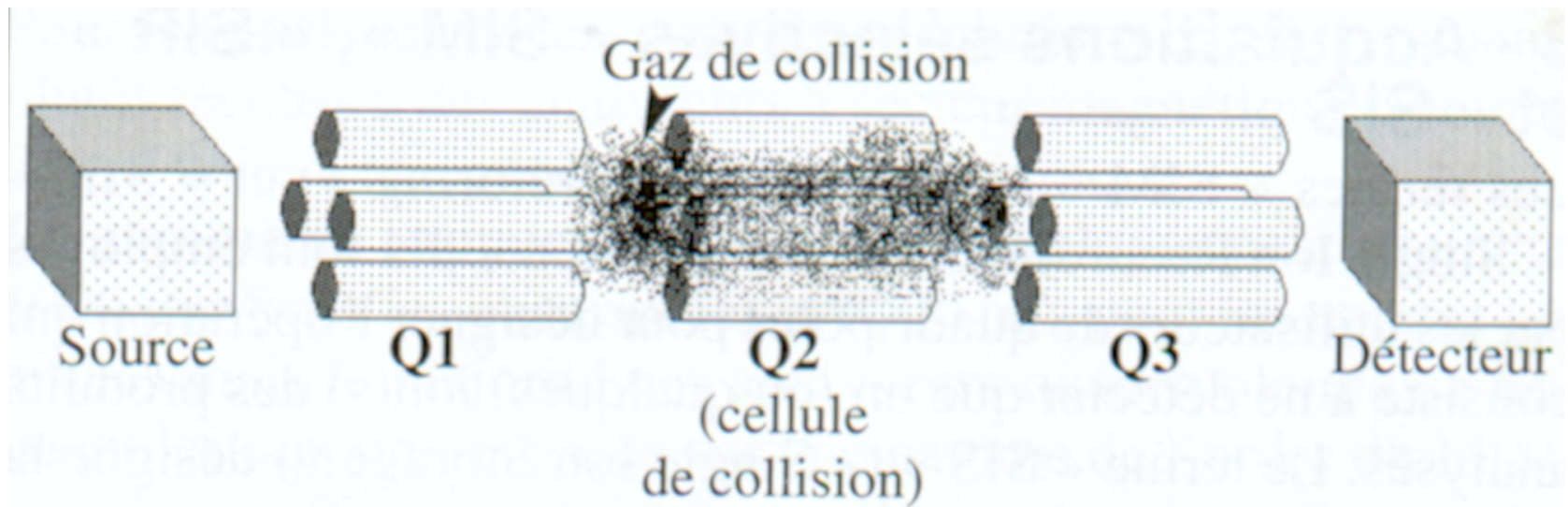
Print

Exit

Help

MS/MS et MSⁿ

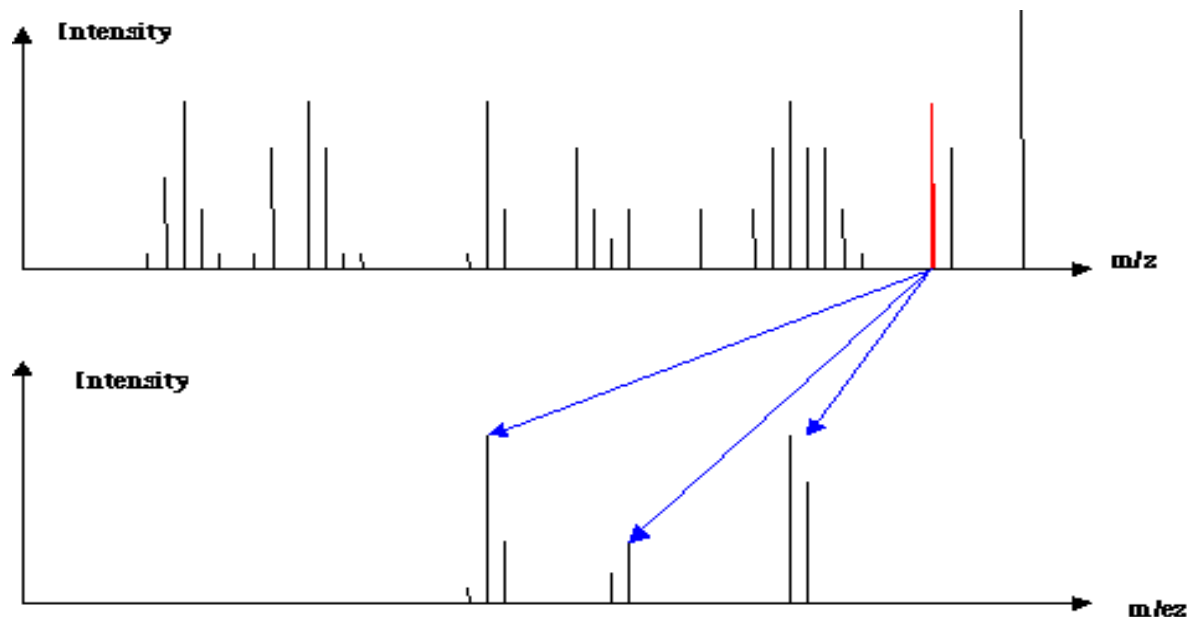
- -soit avec trappe \rightarrow MSⁿ
- -soit triple quad \rightarrow MS-MS



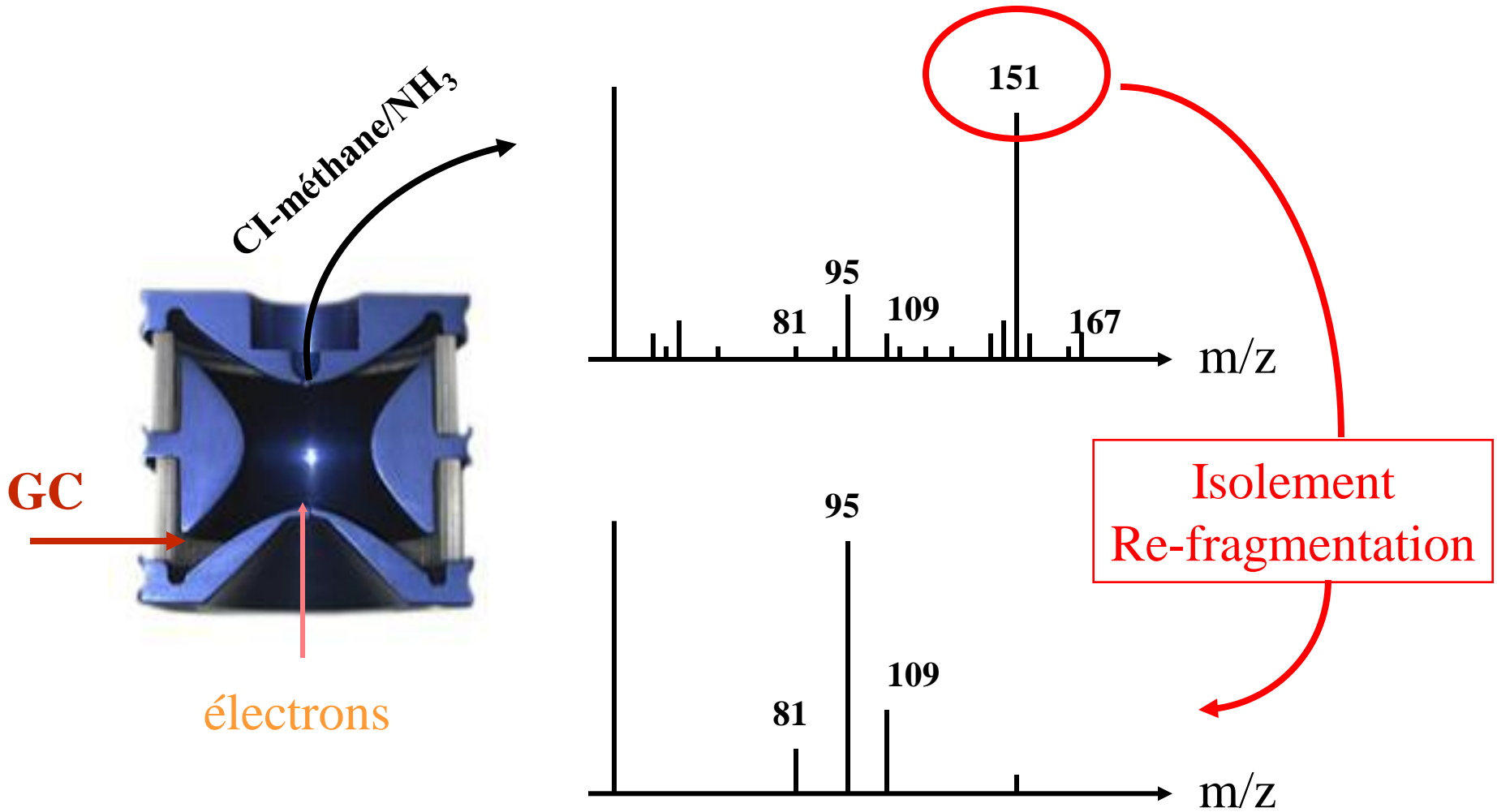
Triple quad

4 étapes de la MS-MS

- Formation des ions et éjection des ions
- Isolement de l'ion parent
- Formation de l'ion fils
- Analyse des ions fils produits

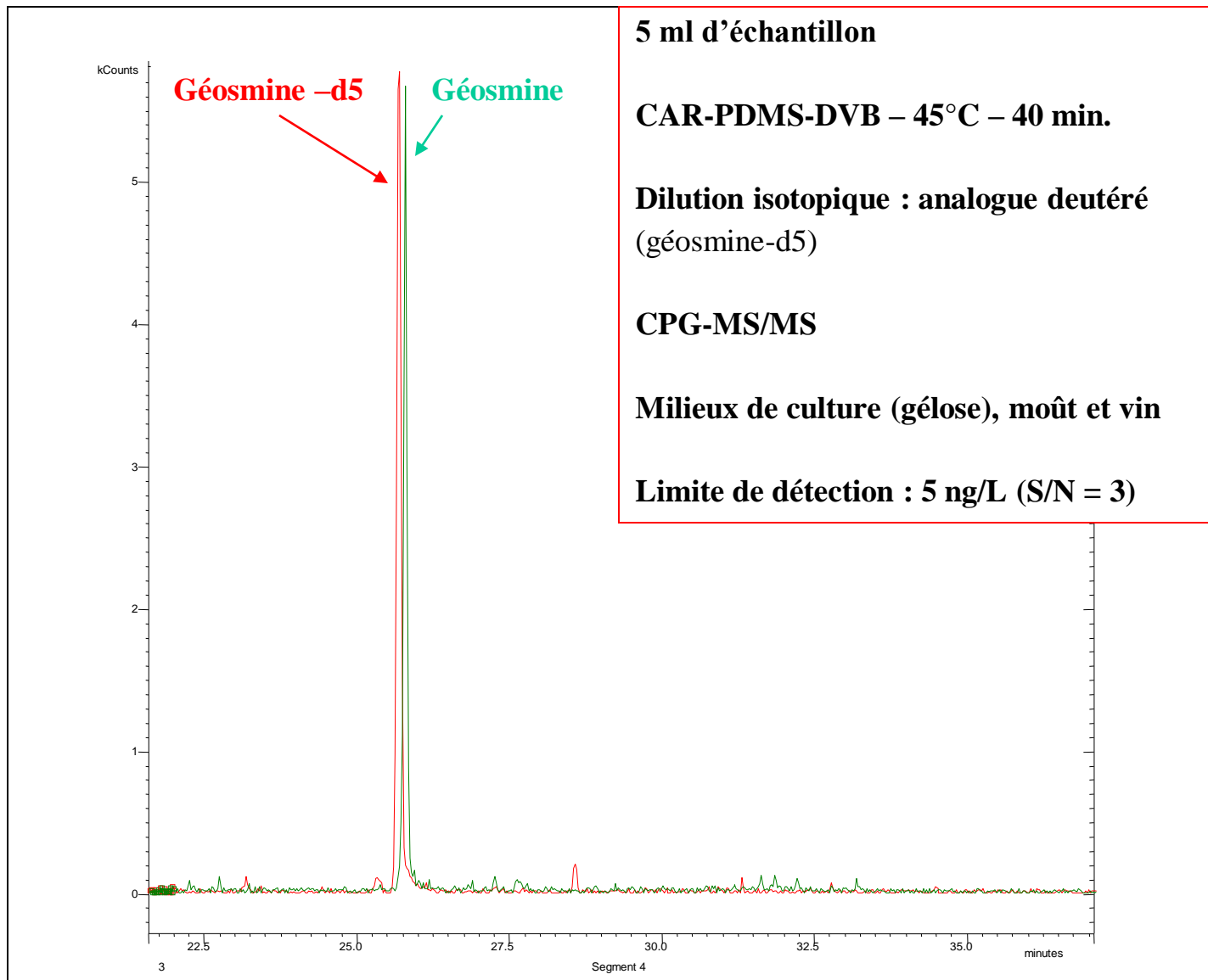


Analyse GC - MS/MS : exemple du 2-MIB



Gain en sélectivité, en sensibilité, sans perte d'identité

Analyse de la géosmine dans les moûts



La réponse : chromatogramme en nbre de coups

T I C : M U S D E _ 1 5 . D (+ , -)

a n c e

0 0 0 0

0 0 0 0

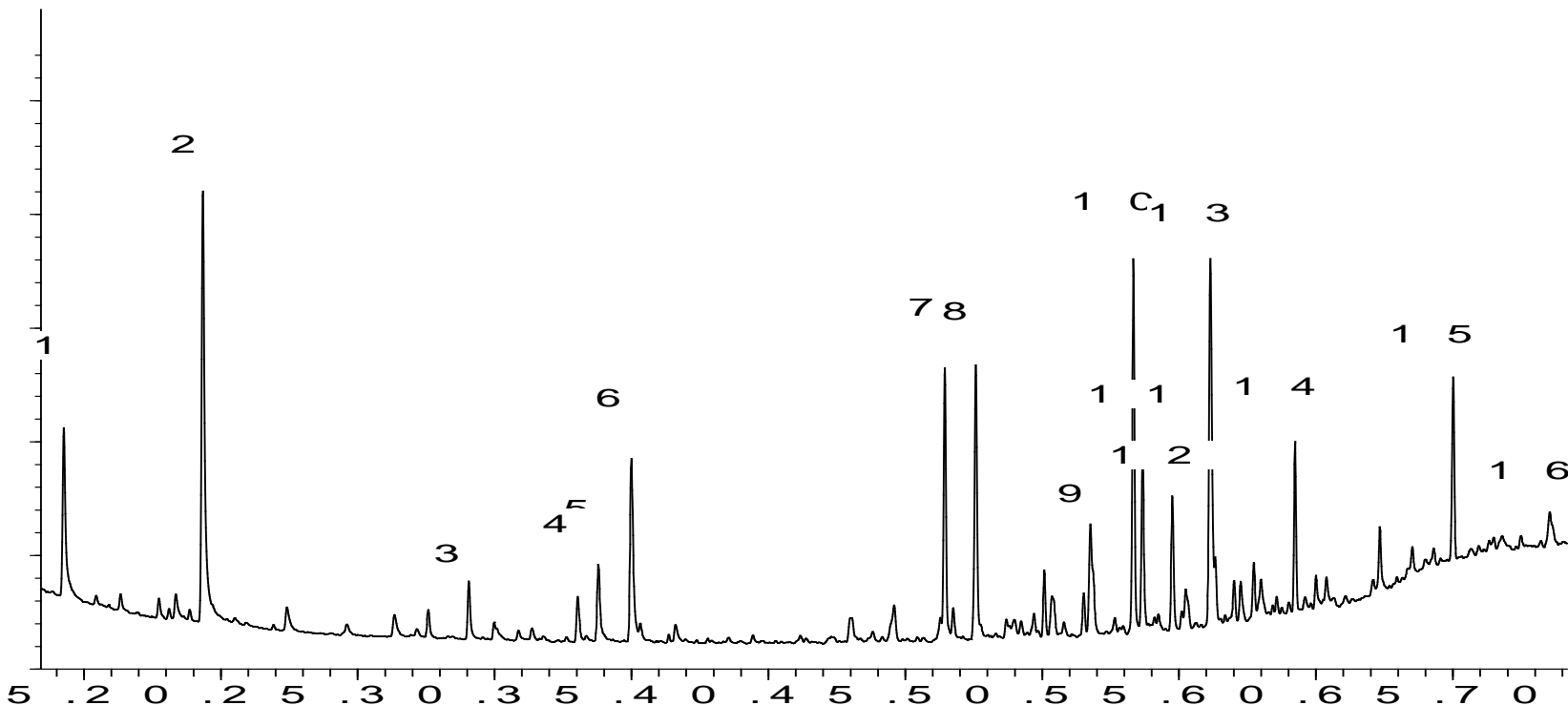
0 0 0 0

0 0 0 0

0 0 0 0

0 0 0 0

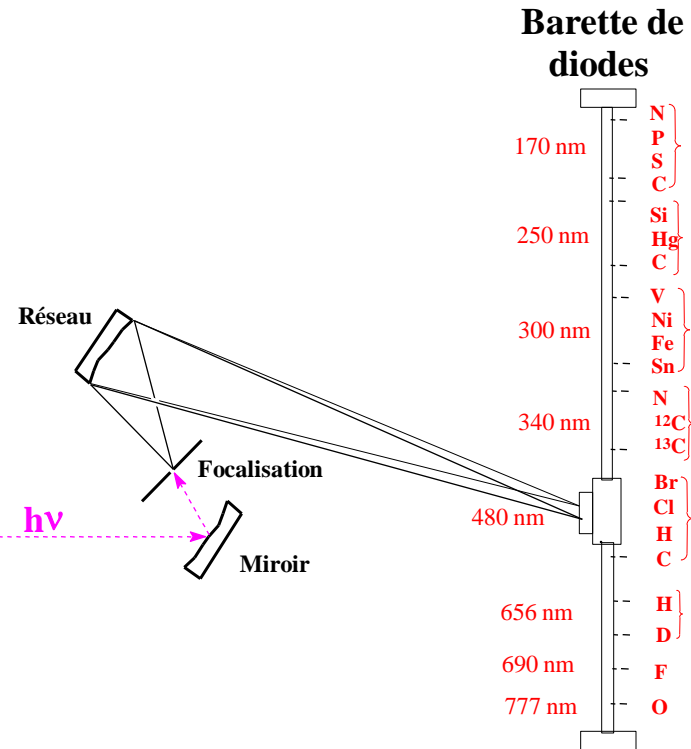
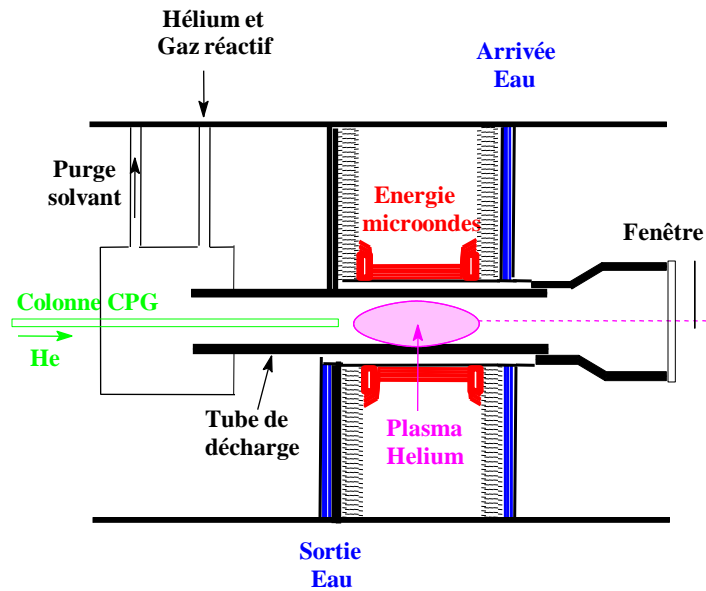
1 e - - >



$$[\text{composé 1}] = k * (\text{Aire})_1$$

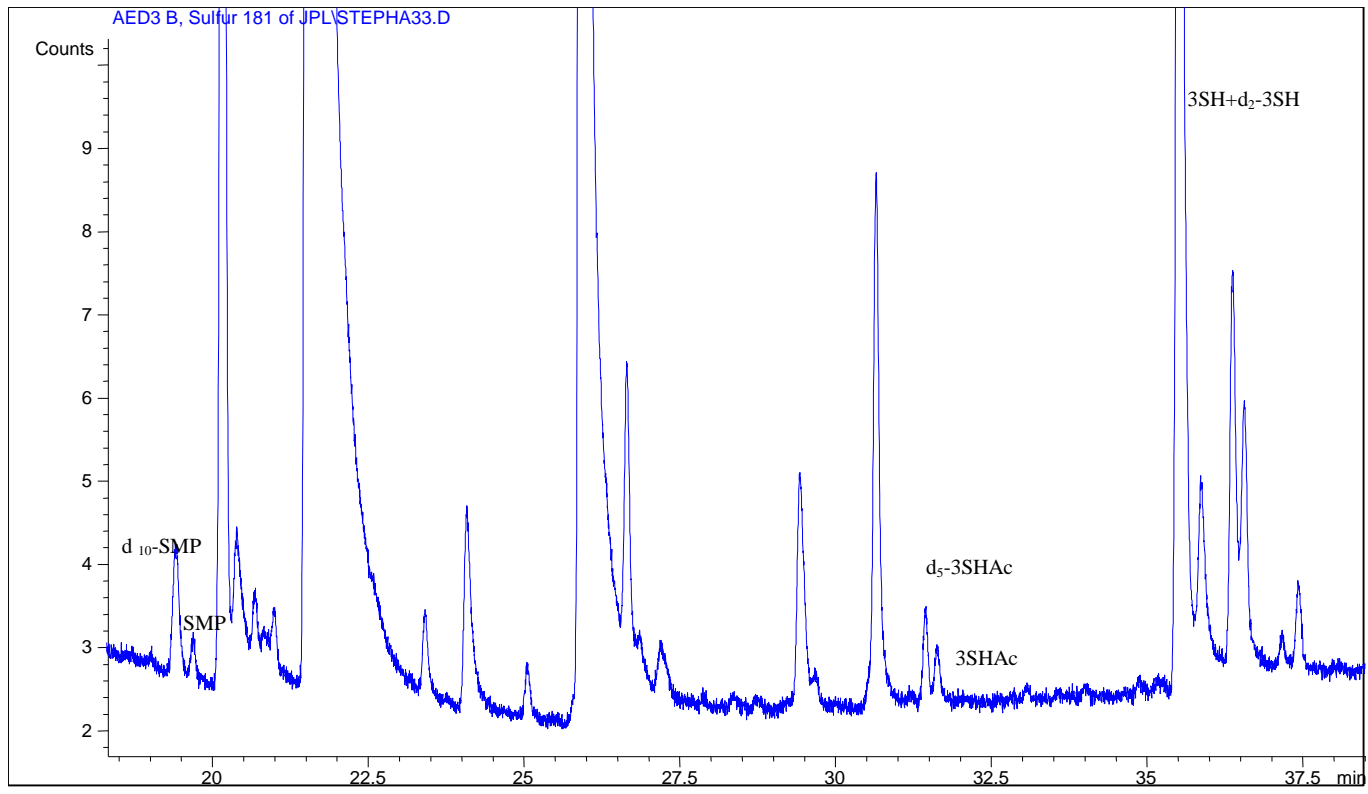
K dépend du composé et des conditions d'analyse

Détection par émission atomique

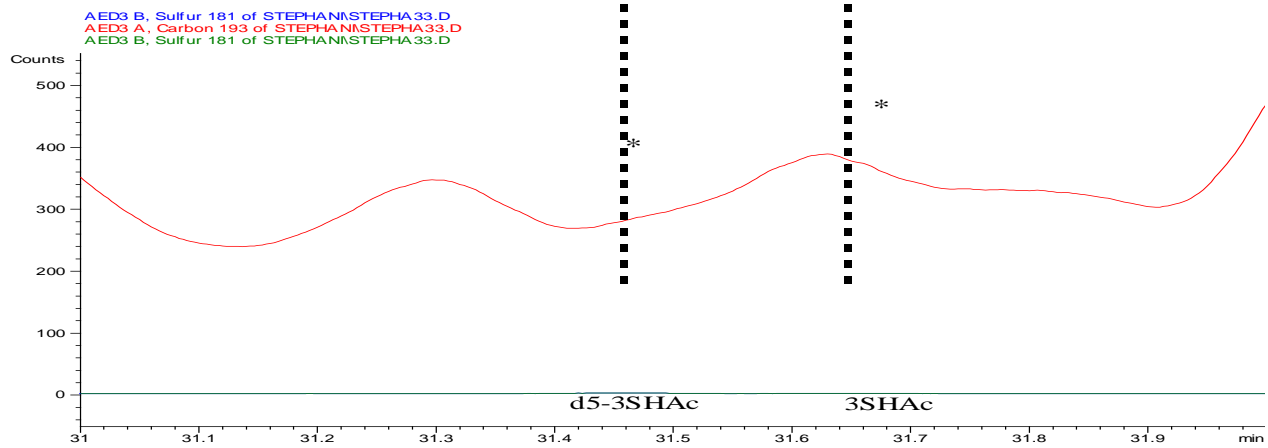
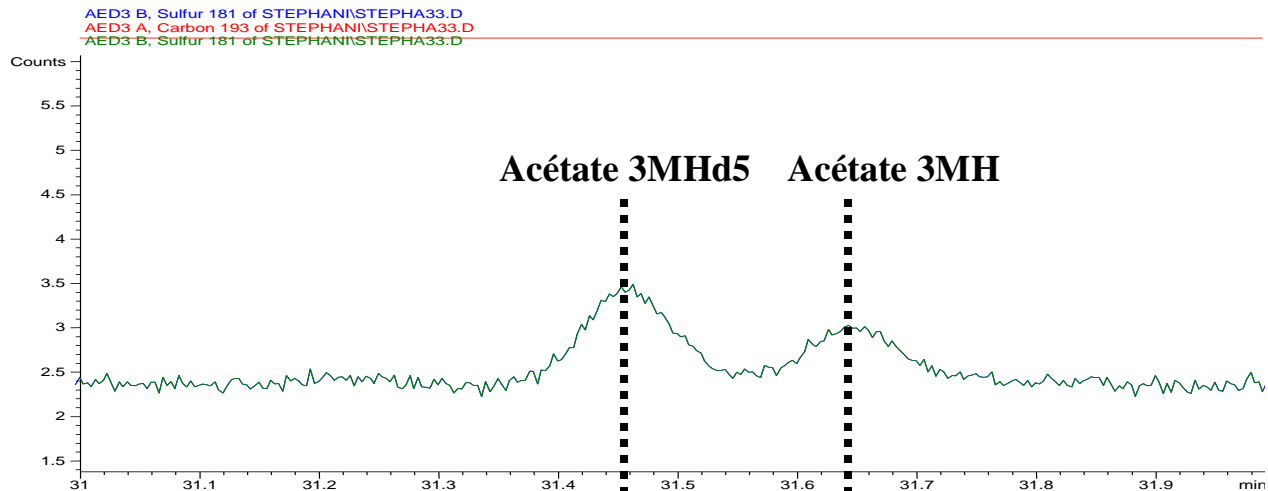


SPECTROMETRE A BARETTE DE DIODES

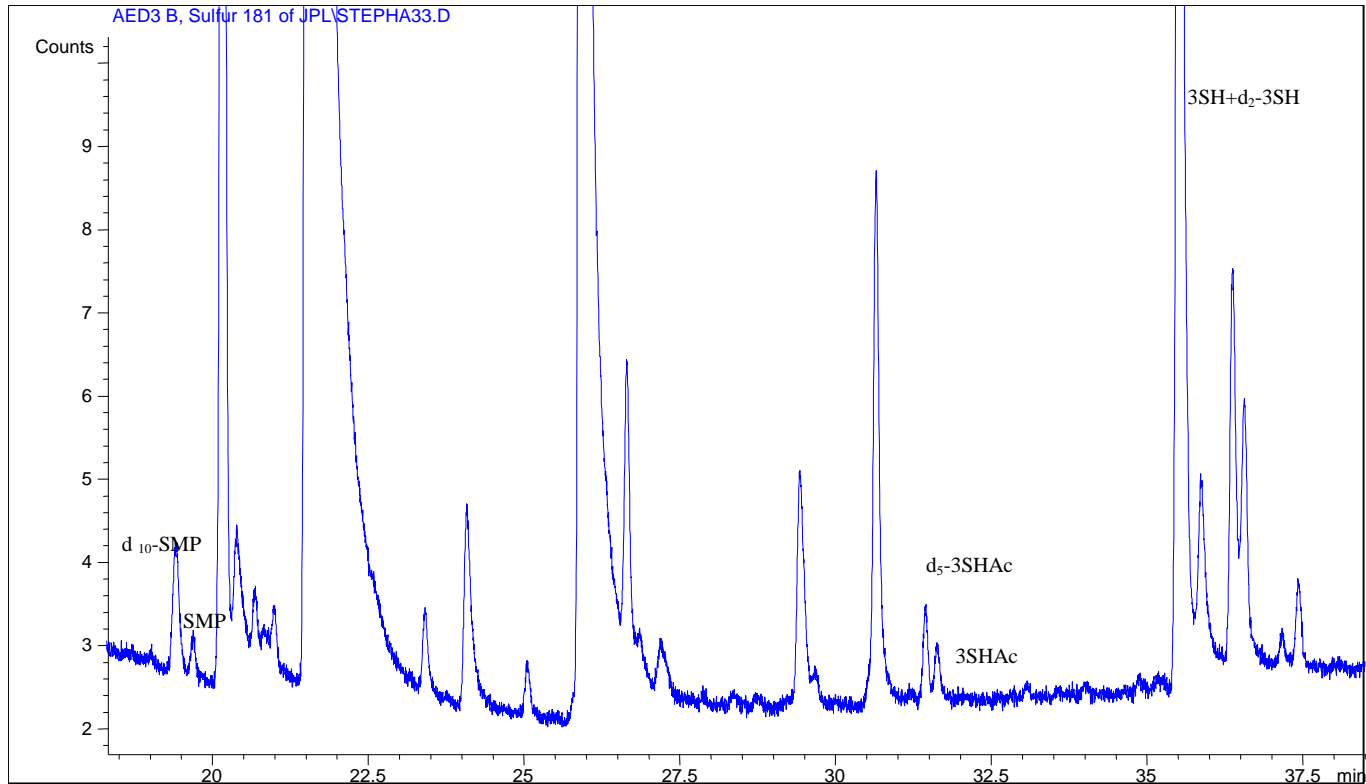
CPG/AED D'UN EXTRAIT DE THIOLS D'UN VIN BLANC DE MUSCADET



Détection par émission atomique

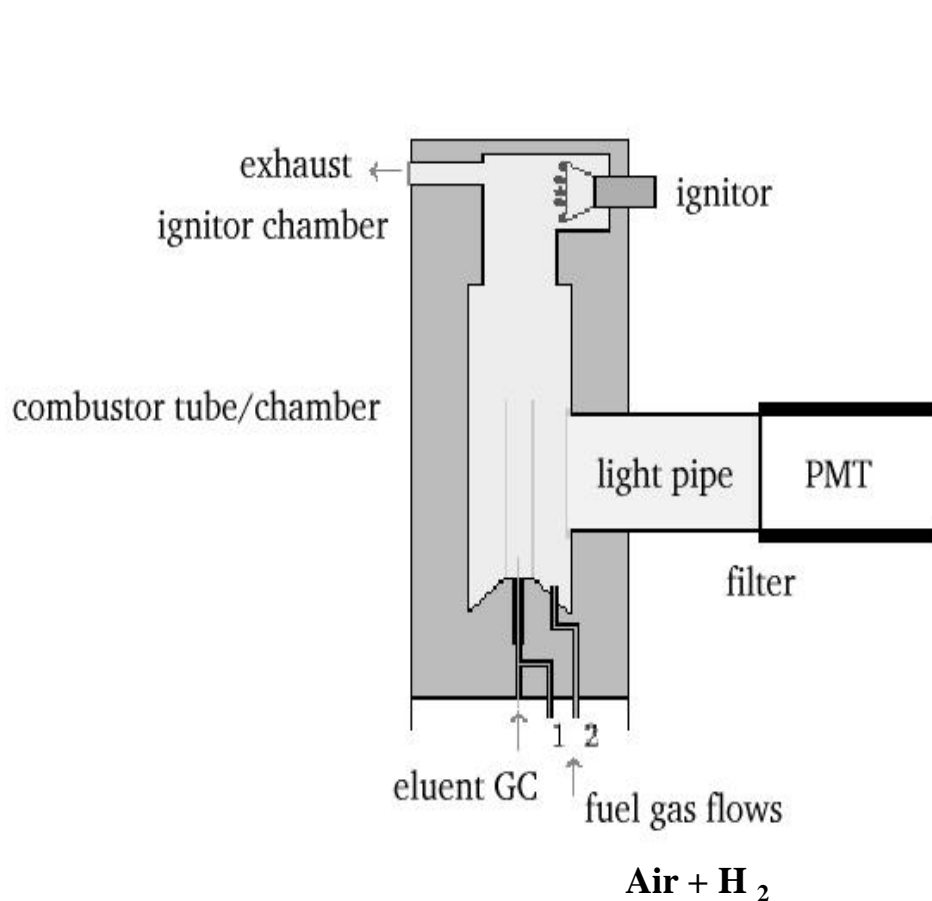


CPG/AED D'UN EXTRAIT DE THIOLS D'UN VIN BLANC DE MUSCADET

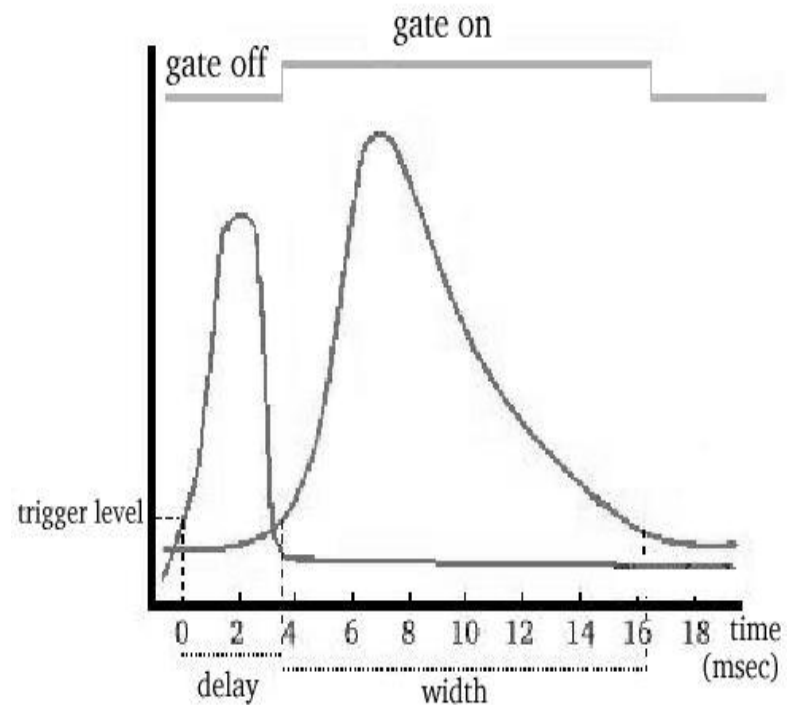


Aire du pic = $k * \text{nbre de moles de l'atome considéré dans la molécule}$
 k indépendant de la structure du composé

DETECTEUR A PHOTOMETRIE DE FLAMME PULSEE

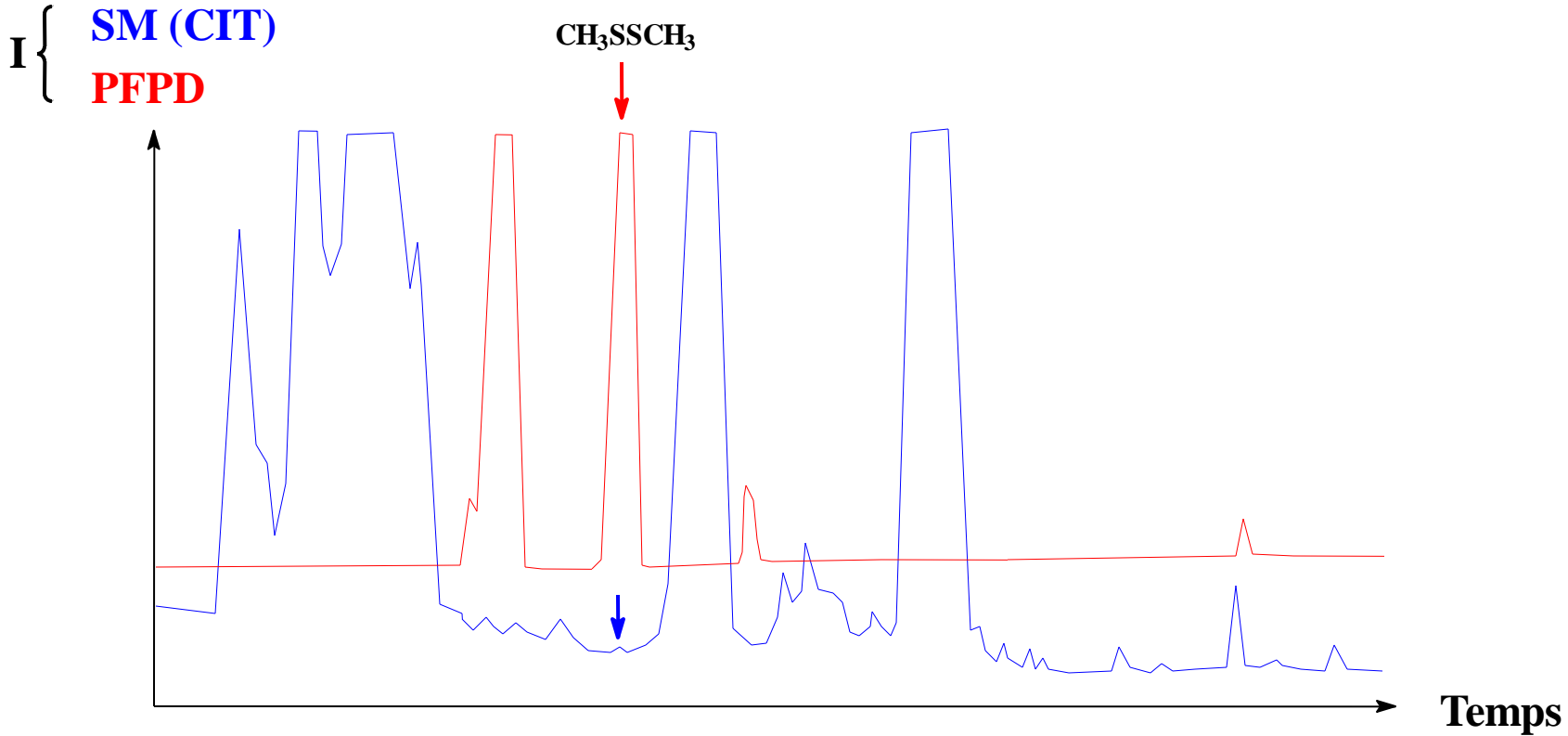


CH* C₂*
OH* S₂* → Rép. Quadrat.
Indép. structure



Autres éléments : P, N, As, Se, Ge, Te, Sb, Br, Ga, In, Cu, Sn.

DETECTION DE COMPOSES SOUFRES TRACES PAR PFPD DANS UN EXTRAIT DE BIERE



Quantification des composés séparés par chromatographie

Réponse du type :

$$\text{Qté composé } i = k * A_i$$

D'où la nécessité de connaître k

Par ailleurs, les techniques mises en œuvre nécessitent toujours une étape d'extraction ce qui entraîne des pertes (rdt d'extraction)

Utilisation d'un standard interne et d'un étalonnage

Quantification des composés séparés par chromatographie

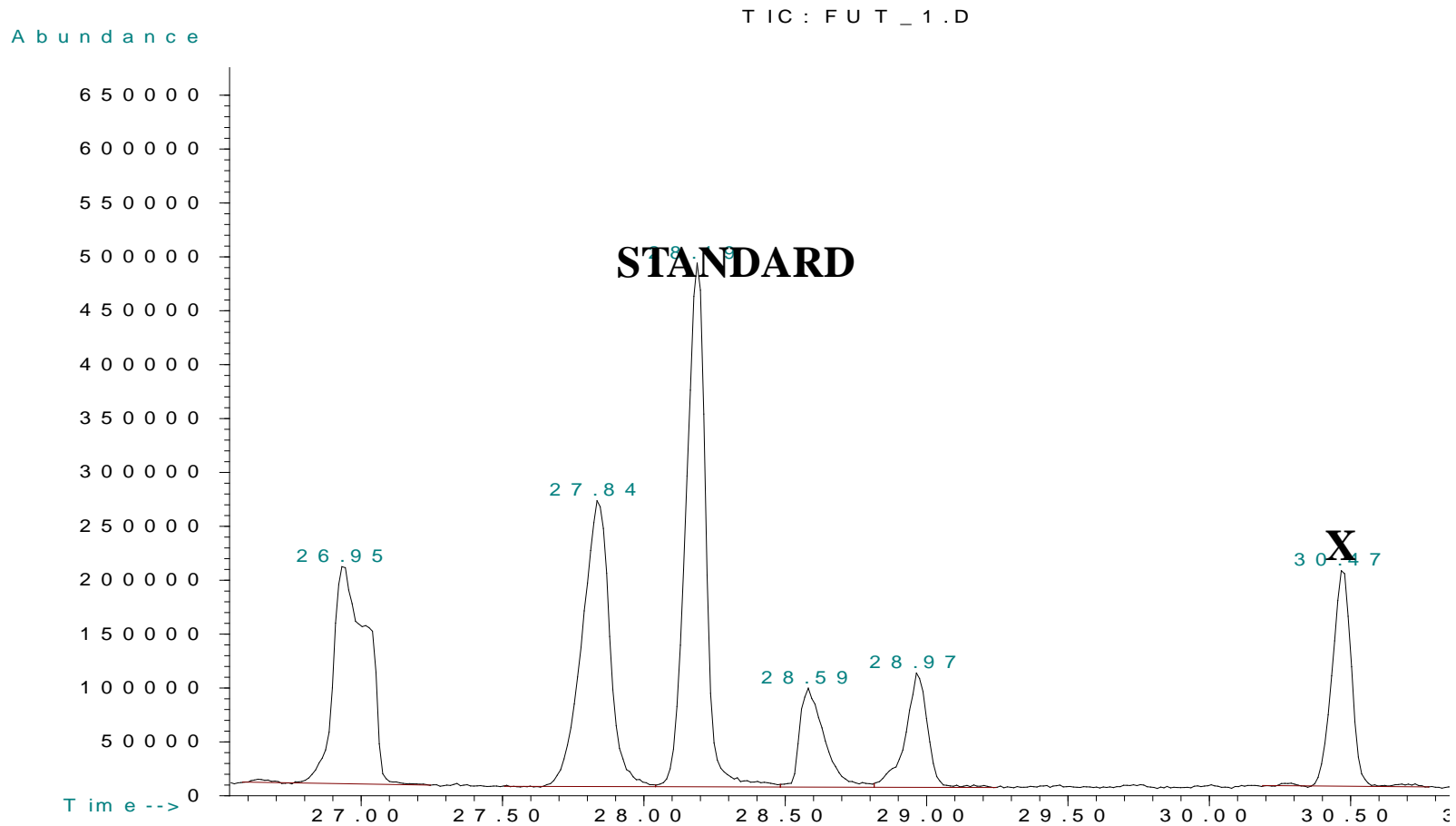
Propriété de l'étalon :

- doit être absent des composés naturels du mélange à analyser
- doit être mis le plus en amont possible : étalon interne
- Ajout à des quantités proches de celles des analytes, toujours identiques
- doit être d'une structure la plus proche possible des analytes

Rôle :

- traceur
- vérification de la bonne marche de l'analyse
- correction des erreurs de manipulation, des pertes inhérentes à l'extraction
- permet de normer le chromatogramme p/o volume extrait injecté

Quantification des composés séparés par chromatographie



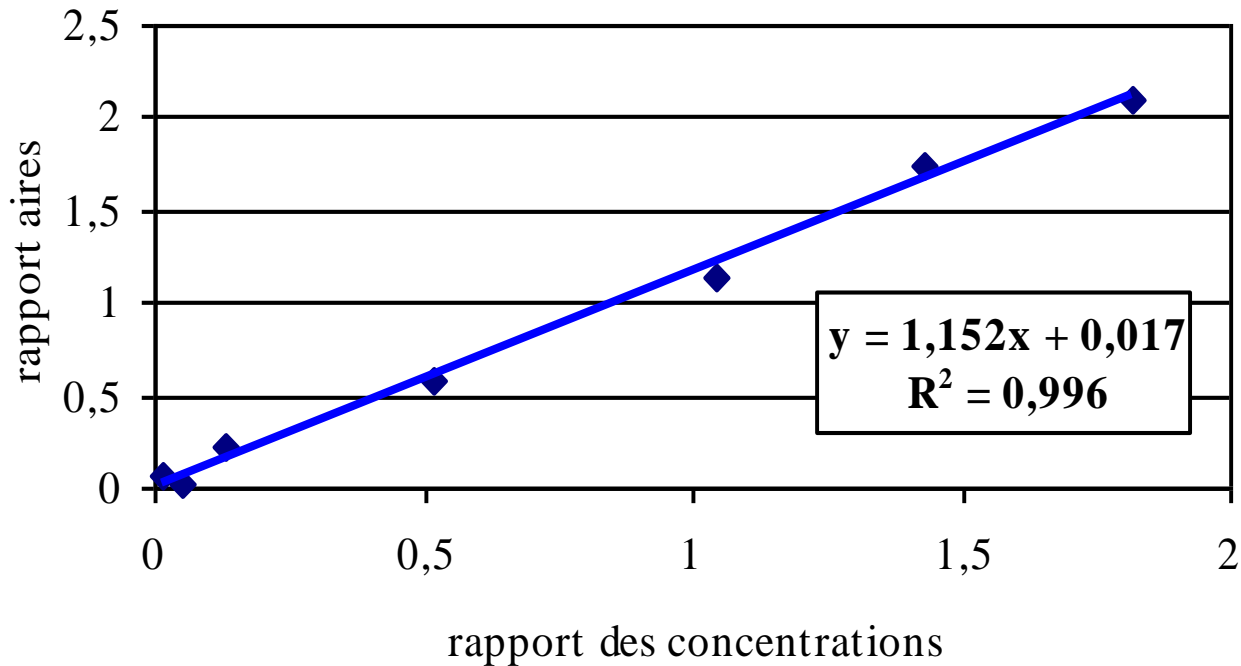
$$[X]/[STD] = K \cdot A_x / A_{std}$$

Etalonnage

BUT : connaître le facteur K

Extraction et Analyse de milieux modèles contenant la même qté de std interne et des qtités croissantes d'analytes

Exemple de la 4MMP en AED



$$[X]/[STD] = K \cdot A_x / A_{std}$$

La dilution isotopique

Utilisation comme standard interne d'une analogue de l'analyte, marqué par des isotopes stables (deutérium, ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N)

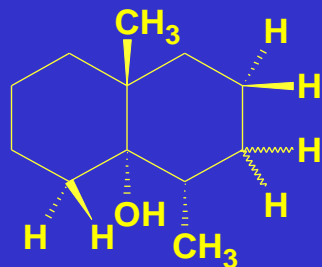
Avantages :

- Même comportement physico-chimique que l'analyte, donc corrige les pertes dues aux rdt d'extraction, aux dégradations en cours d'extraction, parfois difficilement contrôlables
- traceur de l'analyte (sort juste à côté en CPG)

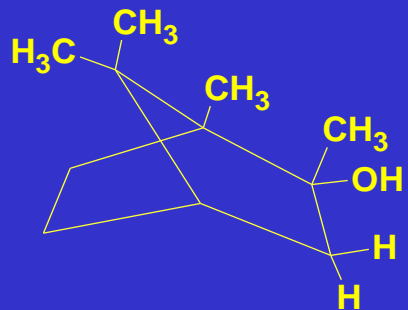
Limites :

- mal résolu de l'analyte en CPG donc nécessité de la SM
- synthèse souvent nécessaire car pas commercial
- un standard marqué par analyte
- stabilité isotopique à vérifier

Quelques exemples



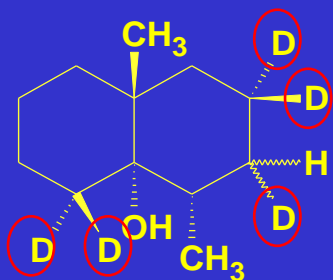
PM = 182



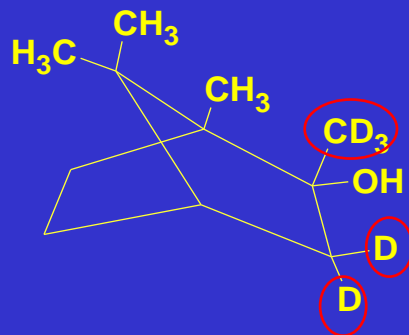
PM = 168



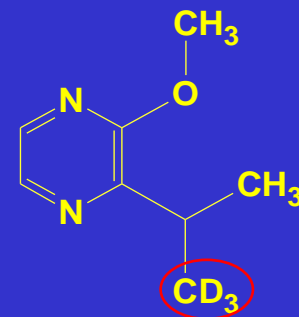
PM = 152



PM = 187



PM = 173

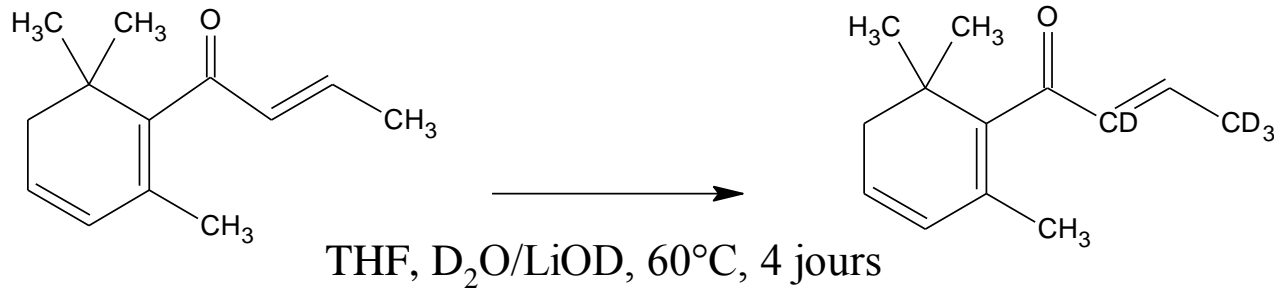


PM = 155

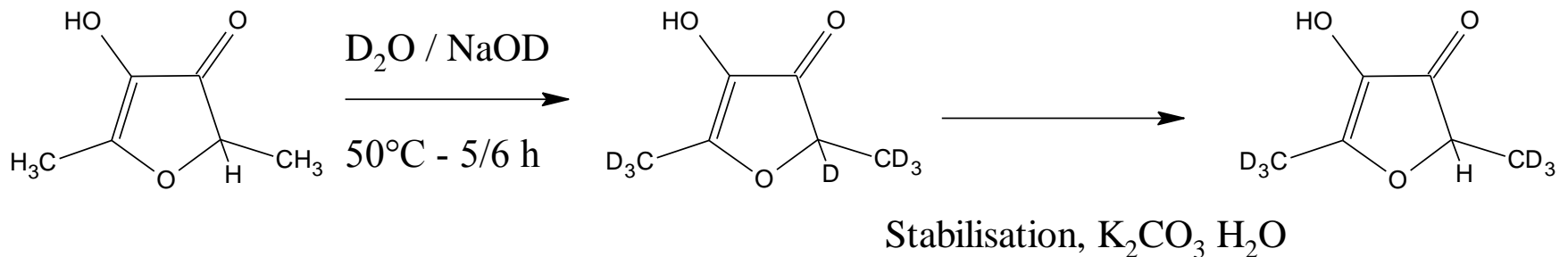
Principes de qqs synthèses

Synthèse par échange H/D

β -damascénone d4



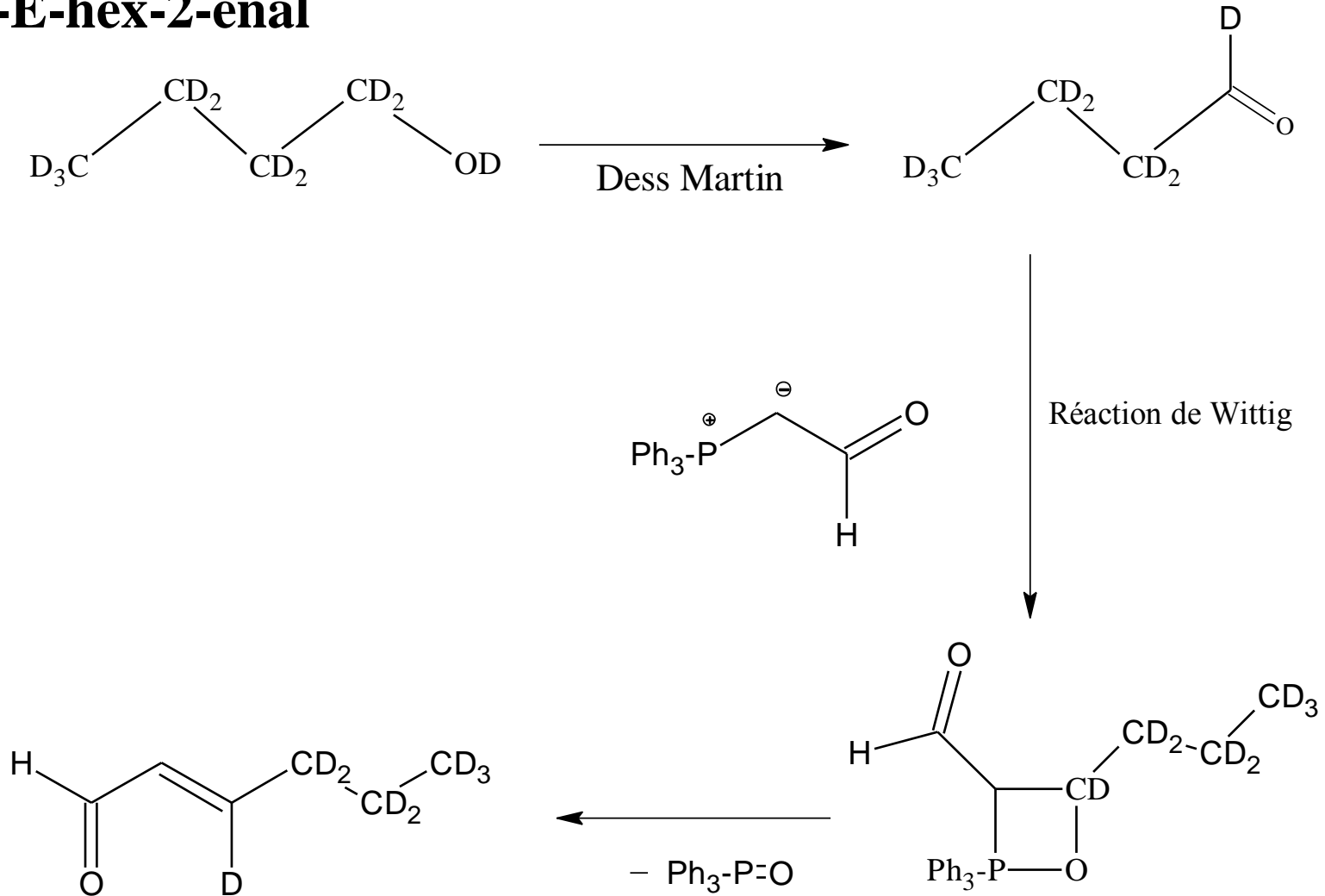
Furanéol d6



Principes de qqs synthèses

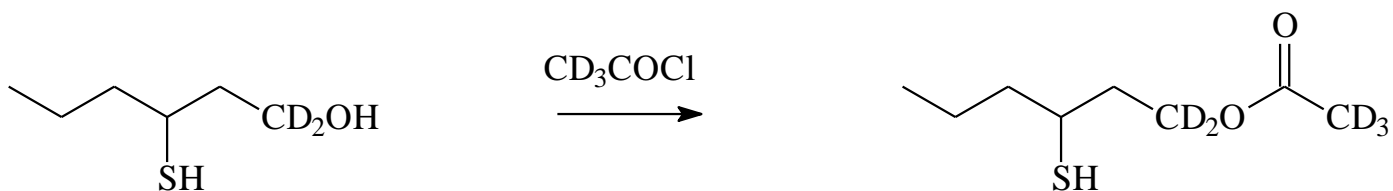
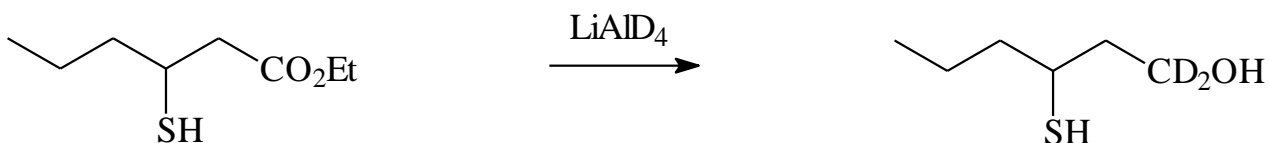
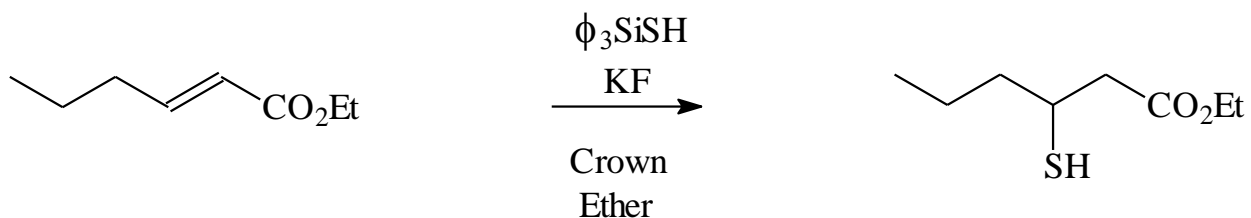
Incorporation de synthons marqués

[²H]₈-E-hex-2-èneal

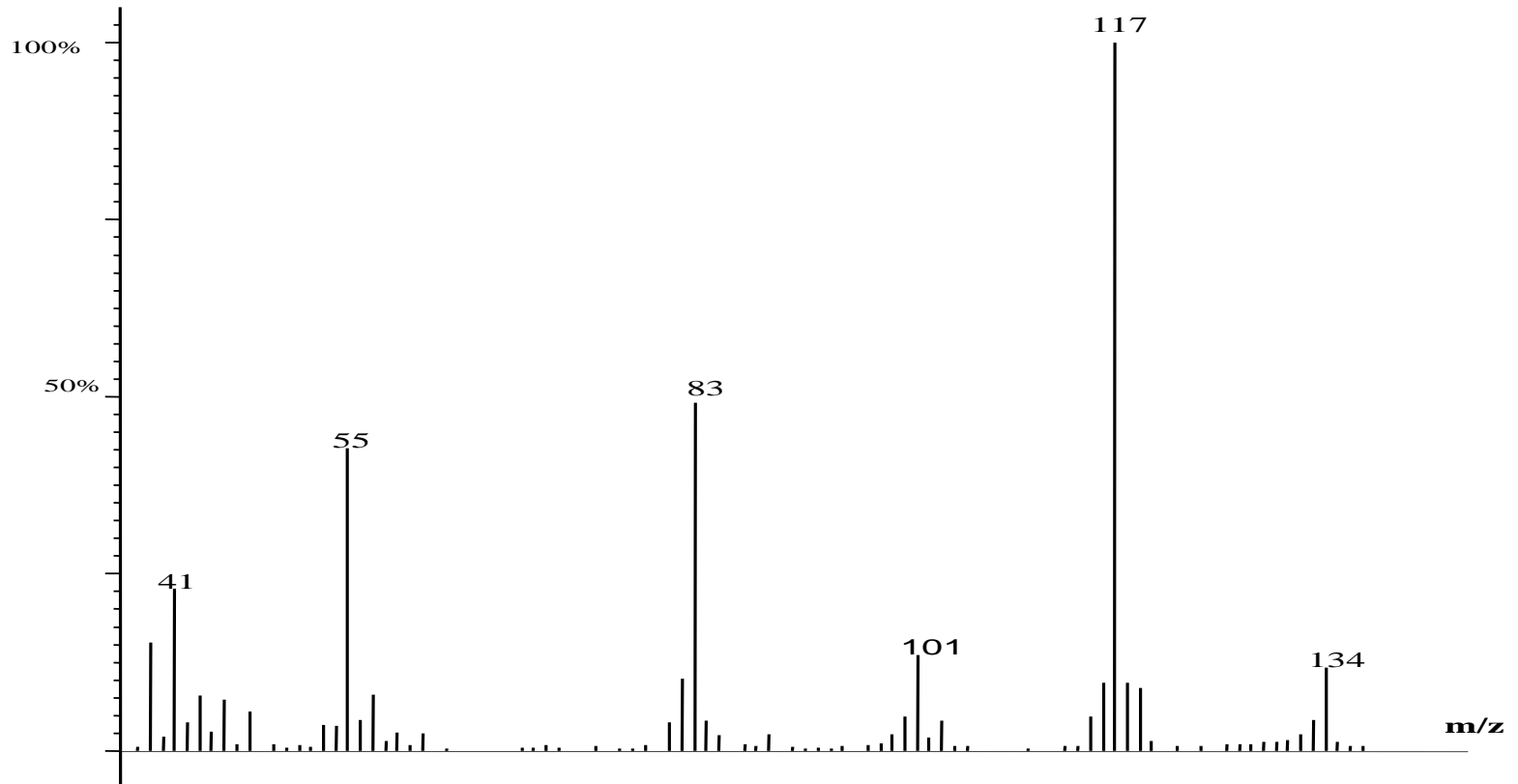


Principes de qqs synthèses

3-MH et Ac3MH

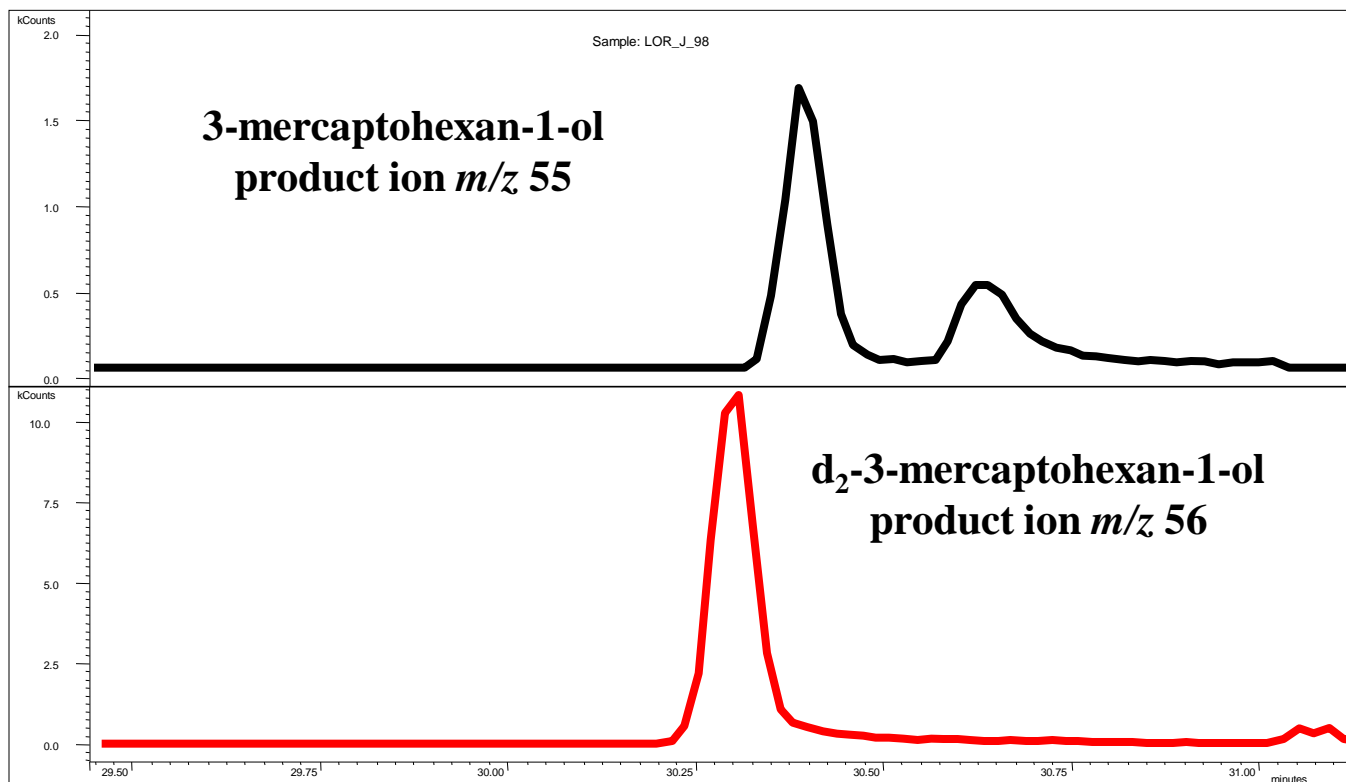


Spectre de Masse en CI-méthane du 3-mercaptohexanol



Analyse par CPG-MS/MS et dilution isotopique du 3-mercaptohexanol

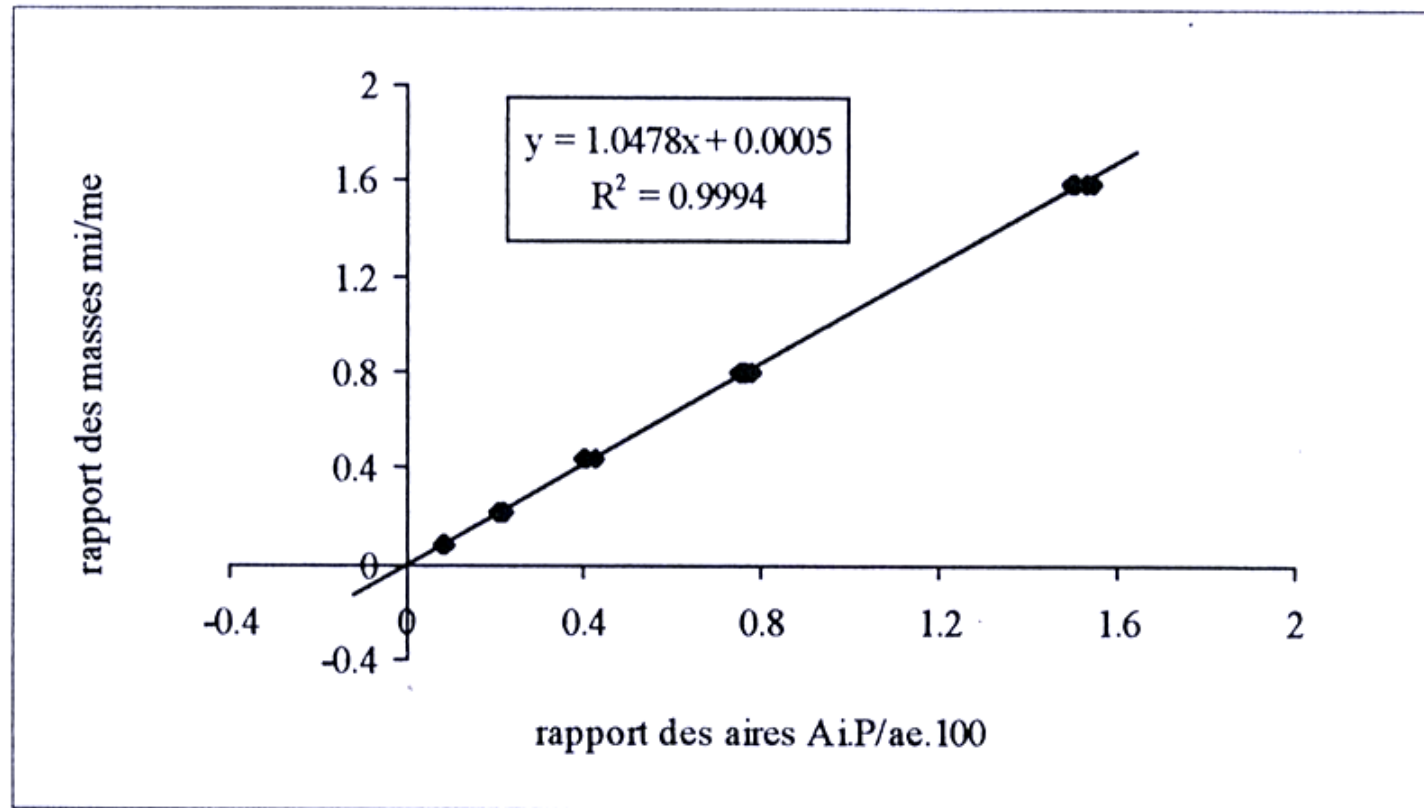
Chromatogrammes obtenus



Etalonnage

Détermination du coefficient de réponse relatif k_i/k_e du cinnamate d'éthyle par rapport au cinnamate d'éthyle deutérié (isotope Md3)

$k_i/k_e = 1,05$



Stabilité isotopique

Pourcentages des différents isotopes contenus dans les composés deutériés

		avant extraction	après extraction	test 2i
cinnamate d'éthyle deutérié				
M	176	0,32 % (5,9 %) ^a	0,35 % (7,3 %) ^b	ns
Md3	179	99,68 % (0,2 %)	99,65 % (0,9 %)	ns
guaiacol deutérié				
M	124	0,24 % (4,0 %)	0,22 % (10,2 %)	ns
Md3	127	99,76 % (0 %)	99,78 % (0,7 %)	ns
cyclotène deutérié				
M	112	0,39 % (2,8 %)	0,35 % (4,8 %)	ns
Md1	113	1,09 % (1,8 %)	1,04 % (5,4 %)	ns
Md2	114	2,73 % (0,7 %)	2,73 % (3,3 %)	ns
Md3	115	14,55 % (0,3 %)	14,49 % (1,1 %)	ns
Md4	116	31,19 % (0,2 %)	31,84 % (0,9 %)	ns
Md5	117	41,48 % (0,2 %)	41,58 % (3,2 %)	ns
Md6	118	8,57 % (0,8 %)	7,97 % (8,5 %)	ns
maltol deutérié				
M	126	0,84 % (3,1 %)	0,78 % (4,5 %)	ns
Md1	127	6,45 % (1,3 %)	5,70 % (7,0 %)	ns
Md2	128	25,56 % (0,4 %)	24,94 % (1,3 %)	ns
Md3	129	67,15 % (0,3 %)	68,58 % (0,7 %)	ns
pyranone deutériée				
M	112	0,14 % (6,5 %)	0,18 % (7,8 %)	ns
Md3	115	99,86 % (0 %)	99,82 % (0,5 %)	ns

a : coefficient de variation sur trois répétitions : trois analyses en mode SIM d'une même solution dans l'acétate d'éthyle à 100 mg/l

b : coefficient de variation sur trois répétitions : trois analyses en mode SIM de trois extraits obtenus selon le même protocole

Résumé des tendances en analyse des composés d'arôme

1 – Simplification de la préparation des échantillons :

- peu ou pas de solvant
- volume restreint d'échantillon
- rapidité
- automatisation

2 – Augmentation des performances de la chromatographie

- résolution accrue (compréhensive GC)
- rapidité (fast GC)
- compacité des appareillages

3 – Sensibilité et spécificités des détecteurs :

- détecteurs spécifiques
- spectrométrie de masse et SM/SM