

## RÉSOLUTION OIV/OENO 352/2009

### METHODE DE DIFFÉRENCIATION DES TANINS OENOLOGIQUES COMMERCIAUX – MODIFICATION DE LA MONOGRAPHIE

L'ASSEMBLÉE GÉNÉRALE

VU l'article 2, paragraphe 2 iii de l'Accord portant création de l'Organisation internationale de la vigne et du vin,

APRES AVOIR étudié la recherche réalisée par la sous-commission "Méthodes d'analyse" et le groupe d'experts "Spécification des produits oenologiques",

CONSIDÉRANT la résolution OENO 12/2002 concernant la monographie sur les tanins œnologiques,

DÉCIDE, sur proposition de la Commission II "Oenologie", de modifier la monographie existante et de la compléter par l'addition d'une annexe relative à la méthode suivante.

### DIFFÉRENCIATION DES TANINS OENOLOGIQUES COMMERCIAUX PAR ANALYSE CG/SM DES MONOSACCHARIDES ET DES POLYOLS

#### 1. Introduction

Selon le codex œnologique international de l'O.I.V., les tanins œnologiques devraient être extraits de noix de galle (*de Quercus*, tels que galles d'Alep), de Tara, également appelé *Caesalpina Spinosa*, du bois de chêne (*quercus* sp.), de pépins et pellicules de raisin (*Vitis vinifera*) et du bois de certains arbres tels que le quebracho (*Schinopsis balansae*) et le châtaignier (*Castanea* sp.).

#### 2. Domaine d'application

La méthode décrite permet de différencier des tanins œnologiques commerciaux de différentes origines (galles végétales, pépins et pellicules de raisin, bois de chêne, de châtaignier et de quebracho).

#### 3. Principe

La concentration de monosaccharides (arabinose, xylose, fructose et glucose) et de polyols (arabitol, quercitol, pinitol, chirositol, mucositol, scylloinositol et

mesoinositol) dans des échantillons de tanin a été déterminée par couplage chromatographie en phase gazeuse/ spectrométrie de masse (CGSM) après leur dérivatisation préalable en triméthylsilyléthers.

## 4. Réactif et produits

### *Réactifs*

Triméthylsilylimidazole (TMSI) pur à 97 %

Triméthylchlorosilane (TMCS)

Pyridine anhydre, pure à 99,5 %

Eau de grande pureté issue d'un système Milli-Q A10

### *Étalons*

Phényle- $\alpha$ -glucoside (étalon interne) : 1 mg.mL<sup>-1</sup> préparé dans du méthanol à 70 %

### *Préparation des solutions étalons (de monosaccharides et de polyols)*

Les solutions étalons de glucose, fructose, arabinose, xylose, arabitol, pinitol, myoinositol, scylloinositol, mucoinositol et chiroinositol ont été dissoutes dans un mélange méthanol :eau (30:70) à des concentrations variant entre 0,05 et 0,5 mg/mL de chaque étalon. Étant donné que le quercitol et le bornesitol ne sont pas disponibles dans le commerce, des extraits aqueux ont été préparés à partir de glands de chêne *Quercus sp.* et de feuilles *d'Echium vulgare*. Les extraits ont été concentrés par évaporation sous vide à basse température, silylés, puis injectés comme indiqué ci-dessous. La teneur en hydrates de carbone (triple détermination, RSD  $\pm$  5 %) est de 68 % de quercitol, 20 % de glucose et 18 % de fructose pour l'extrait de chêne, et 20 % de fructose, 33 % de glucose, 27 % de bornesitol, 2 % de mesoinositol et 19 % de saccharose pour l'extrait *d'Echium*.

Remarque : Les solutions étalons doivent de préférence être préparées chaque jour et conservées dans un réfrigérateur avant injection. Les échantillons doivent être dérivatisés et analysés dans la même journée.

## 5. Échantillons

Vingt-huit échantillons de différents tanins commerciaux, parmi lesquels des tanins de bois de chêne (O ; n=4), pépin de raisin (S ; n=6), pellicule de raisin (H ; n=2), galles végétales (G ; n=6), châtaignier (ch ; n=3), quebracho (Q ; n=3), gambier (GMB ; n=1) et mélanges de raisin+quebracho (GQ ; n=1), quebracho+châtaignier+galle végétale (QChG ; n=1) et châtaignier+quebracho (ChQ ; n=1), ont été achetés directement sur le

marché ou fournis par des fabricants.

## 6. Appareillage

- Hotte de laboratoire
- Verrerie de laboratoire : béchers, récipients, etc.
- Micropipettes
- Évaporateur rotatif
- Vortex
- Broyeur
- Centrifugeuse
- Chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (DIF) - Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur à spectrométrie de masse opérant en mode impact électronique à 70 eV. Les données MS sont enregistrées de 40 à 700 m/z.
- Colonne en silice fondue de 25 m X 0,25 mm de diamètre intérieur X 0,25 d'épaisseur de film, enduite de méthylsilicone réticulé.

## 7. Mode opératoire

### *Procédure de dérivation*

50 mg de tanins sont dissous dans 5 mL d'eau désionisée et filtrée à l'aide d'un papier filtre Whatman n° 1 ou équivalent. L'étalon interne est obtenu en mélangeant 1 mL d'échantillon et 1 mL de phényle- $\beta$ -glucoside. Le mélange est concentré par évaporation sous vide et des dérivés triméthylsilylés sont obtenus par ajout de 100  $\mu$ L de pyridine anhydre, 100  $\mu$ L de TMSI et de 100  $\mu$ L de TMCS, en agitant après chaque ajout. L'extraction des dérivés triméthylsilylés (TMS) est effectuée avec 100  $\mu$ L d'hexane et 200  $\mu$ L d'eau..

### *Analyse par chromatographie gazeuse*

1  $\mu$ L de la couche supérieure d'hexane est injecté sur le chromatographe en phase gazeuse. L'identité de chaque composé est confirmée par comparaison de leurs temps de rétention et spectres de masse, obtenus par CGSM, avec ceux des étalons. Le profil

chromatographique type de chaque origine de tanin est illustré en Figure 1.

*Analyse par CG-DIF.*- conditions chromatographiques

Les injections sont faites en mode "splitless" Température de l'injecteur et du détecteur : 300 °C. La température du four est maintenue à 100 °C pendant 1 minute, programmée à 200 °C moyennant une vitesse de chauffage de 30 °C.min<sup>-1</sup> et maintenue pendant 15 minutes, et finalement programmée à 270 °C à 15 °C min<sup>-1</sup> et maintenue pendant 20 minutes. Le gaz vecteur est l'azote..

*Analyse CGSM.* conditions chromatographiques - Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur de masse quadripolaire (HP 6890 ou similaire) fonctionnant en mode impact électronique (IE) à 70 eV. Les données SM ont été enregistrées de 40 à 700 m/z.

- Conditions chromatographiques :

Les injections sont faites en mode splitless. L'injecteur est à 300 °C et la température du four est maintenue à 100 °C pendant 1 minute, puis programmée à 200 °C moyennant une vitesse de chauffage de 30 °C min<sup>-1</sup> et maintenue pendant 15 minutes, et finalement programmée à 270 °C à 15 °C min<sup>-1</sup> et maintenue pendant 20 minutes. Le gaz vecteur est de l'hélium à 1 mL min<sup>-1</sup>.

## 8. Calcul (Résultats)

L'analyse quantitative est effectuée à l'aide du facteur de réponse (FR) de chaque étalon par rapport au phényle- $\beta$ -D-glucoside (étalon interne) sur la plage attendue. La reproductibilité de la méthode est évaluée par analyse d'un échantillon sur cinq jours différents. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de distinguer les tanins de quebracho des tanins de pellicule de raisins. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) (Tableaux 1 et 2) sont calculées pour chaque composé selon la méthode de Foley et Dorsey (1984). Des valeurs moyennes de 0,42 ng et 1,41 ng injectés ont été respectivement obtenues pour la LD et la LQ. Les concentrations des polyols et des monosaccharides dans les tanins analysés sont présentées respectivement dans les tableaux 3 et 4.

Cette méthode permet de classer les tanins selon le schéma proposé en Figure 2. Le quercitol révèle la présence de tanins de bois de chêne, tandis que le pinitol est principalement un indicateur de tanins issus de galles de tara et le bornesitol de tanins du gambier. L'absence d'arabinose et de xylose dans les tanins de galles peut

également aider à la caractérisation de ces échantillons. Par conséquent, le bornesitol, le quercitol, le pinitol, l'arabinose et le xylose pourraient être utilisés pour différencier ces produits avec certitude, et pour distinguer en outre ces tanins du reste des produits analysés. Les tanins de galles et de raisin peuvent être facilement différenciés de ceux d'autres origines en raison de l'absence d'arabinose et de xylose dans leur composition en monosaccharide. En ce qui concerne les échantillons de tanin de raisin, du fructose a pu être observé dans les tanins de pépins de raisin, mais pas les tanins de pellicule de raisin. La présence de mucinositol et de chiroinositol pourrait être utile pour distinguer les tanins de châtaignier de ceux du quebracho ou de pellicule de raisin.

## 9. Bibliographie

1. Carlavilla, C., Villamiel, M., Martínez-Castro, I., Moreno-Arribas, M.V. Occurrence and significance of quercitol and other inositols in wines during oak wood aging. *Am. J. Enol. Vitic.* 2006, 57, 468-473
2. Foley, J.P.; Dorsey, J.G. Clarification of the limit of detection in chromatography. *Chromatographia*, 1984, 18, 503-511
3. Sanz L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas, M.V. Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chem.*, 2008, 111, 778-783

**Tableau 1.** Répétabilité de la méthode de chromatographie gazeuse pour la détermination des hydrates de carbone dans les tanins (échantillon Q3).

|           | Valeur moyenne | Écart type |
|-----------|----------------|------------|
| Xylose    | 0,17           | 0,01       |
| Arabinose | 0,43           | 0,03       |
| Arabitol  | 0,04           | 0,00       |
| Quercitol | 0,00           | 0,00       |

|                |      |      |
|----------------|------|------|
| Fructose       | 0,32 | 0,04 |
| Glucose        | 0,60 | 0,02 |
| Mucoinositol   | 0,02 | 0,00 |
| Chiroinositol  | 0,00 | 0,00 |
| Scylloinositol | 0,00 | 0,00 |
| Mesoinositol   | 0,05 | 0,00 |

Table 2.

**Tableau 2.** Limites de détection (LD) et de quantification (LQ) de la méthode de détermination des hydrates de carbone et polyols dans les échantillons de tanins œnologiques par chromatographie gazeuse (exprimées en ng injectés)

|                | LD (ng) | LQ (ng) |
|----------------|---------|---------|
| Xylose         | 0,50    | 1,66    |
| Arabinose      | 0,66    | 2,21    |
| Arabitol       | 0,21    | 0,70    |
| Fructose       | 1,11    | 3,70    |
| Glucose        | 0,51    | 1,70    |
| Mucoinositol   | 0,16    | 0,52    |
| Chiroinositol  | 0,22    | 0,74    |
| Scylloinositol | 0,20    | 0,68    |

Mesoinositol

0,24

0,80

**Tableau 3.** Concentration des polyols (mg/100g), tr=traces dans les tanins commerciaux

|               |    | mg/100g  |           |         |            |              |               |                |              |
|---------------|----|----------|-----------|---------|------------|--------------|---------------|----------------|--------------|
|               |    | Arabitol | Quercitol | Pinitol | Bornesitol | Mucoinositol | Chiroinositol | Scylloinositol | Mesoinositol |
| Bois de chêne | O1 | 0.06     | 6.92      | -       | -          | 0.10         | 0.10          | 0.52           | 0.49         |
|               | O2 | 0.06     | 4.49      | -       | -          | 0.11         | 0.11          | 0.57           | 0.55         |
|               | O3 | 0.05     | 1.57      | -       | -          | 0.04         | 0.02          | 0.13           | 0.12         |
|               | O4 | 0.09     | 3.14      | -       | -          | 0.14         | 0.17          | 0.17           | 0.30         |

|                             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Galles végétales            | G1   | -    | -    | 0.73 | -    | -    | -    | -    | -    |
|                             | G2   | -    | -    | 0.26 | -    | -    | -    | -    | tr*  |
|                             | G3   | -    | 0.03 | 0.07 | -    | -    | -    | 0.03 | tr   |
|                             | G4   | -    | 0.06 | 0.06 | -    | -    | -    | 0.04 | -    |
|                             | G5   | -    | -    | 1.35 | -    | -    | -    | -    | 0.02 |
|                             | G6   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Pépin de raisin             | S1   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | tr   | 0.16 |
|                             | S2   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | tr   | 0.01 |
|                             | S3   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.38 | 2.34 |
|                             | S4   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | tr   | 0.01 |
|                             | S5   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.01 |
|                             | S6   | 0.64 | -    | -    | -    | -    | -    | tr   | 0.25 |
| Pellicule de raisin         | H1   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
|                             | H2   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | tr   |
| Châtaignier                 | Ch1  | 0.08 | -    | -    | -    | 0.14 | 0.55 | -    | 0.62 |
|                             | Ch2  | 0.04 | -    | 0.49 | -    | 0.03 | 0.33 | -    | 0.05 |
| Quebracho                   | Q1   | tr   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 0.01 |
|                             | Q2   | 0.02 | 0.05 | 0.09 | -    | -    | -    | -    | tr   |
|                             | Q3   | 0.03 | -    | -    | -    | 0.02 | -    | -    | 0.05 |
| Gambier                     | GMB  | 0.01 | -    | tr   | 0.02 | -    | -    | -    | 0.03 |
| Raisin+quebracho            | GQ   | 0.10 | -    | 0.19 | -    | 0.02 | 0.06 | -    | 0.07 |
| Quebracho+Châtaignier+galle | QChG | 0.03 | -    | 0.19 | -    | 0.03 | 0.12 | -    | 0.12 |
| Châtaignier+quebracho       | ChQ  | 0.05 | -    | -    | -    | 0.13 | 0.56 | -    | 0.53 |

Tableau 4. Concentration des monosaccharides (mg/100g) dans les tanins commerciaux

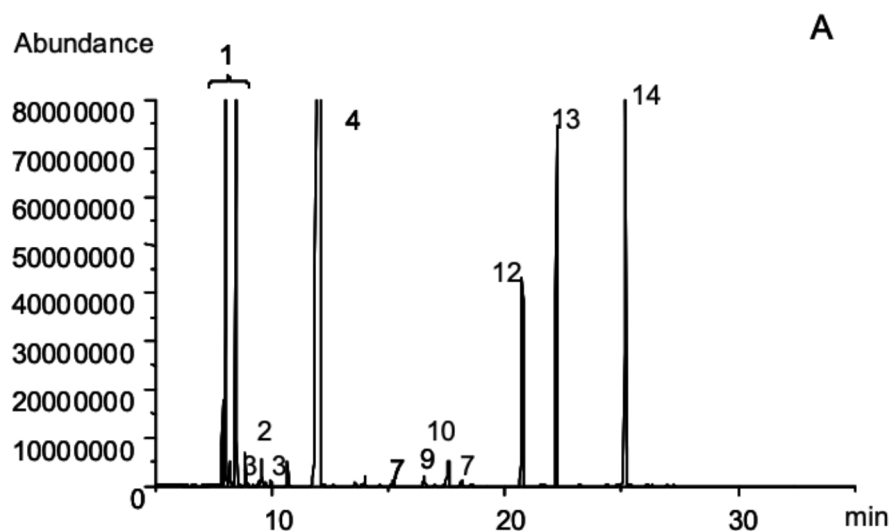
|               |    | mg/100g |           |          |         |
|---------------|----|---------|-----------|----------|---------|
|               |    | Xylose  | Arabinose | Fructose | Glucose |
| Bois de chêne | O1 | 0.29    | 1.18      | -        | 0.22    |
|               | O2 | 0.57    | 2.53      | -        | 0.07    |



|                     |     |      |      |       |       |
|---------------------|-----|------|------|-------|-------|
|                     | O3  | 0.37 | 0.85 | 0.12  | 0.58  |
|                     | O4  | 0.41 | 1.84 | 1.82  | 2.69  |
| Galles végétales    | G1  | -    | -    | 0.26  | 0.42  |
|                     | G2  | -    | -    | 0.07  | 0.17  |
|                     | G3  | -    | -    | 0.05  | 0.05  |
|                     | G4  | -    | -    | 0.11  | 0.16  |
|                     | G5  | -    | -    | 0.50  | 0.63  |
|                     | G6  | -    | -    | -     | -     |
| Pépin de raisin     | S1  | -    | -    | 10.01 | 9.59  |
|                     | S2  | -    | -    | 0.64  | 0.50  |
|                     | S3  | -    | -    | 45.23 | 32.46 |
|                     | S4  | -    | -    | 0.61  | 0.46  |
|                     | S5  | 0.13 | -    | -     | 0.03  |
|                     | S6  | -    | -    | 1.22  | tr    |
| Pellicule de raisin | H1  | -    | -    | -     | 0.07  |
|                     | H2  | 0.31 | 0.48 | 0.30  | 0.67  |
| Châtaignier         | Ch1 | 0.50 | 1.46 | 1.15  | 0.78  |
|                     | Ch2 | 0.41 | 1.04 | 0.95  | 0.91  |
|                     | Ch3 | 0.65 | 1.55 | 0.28  | 0.69  |
| Quebracho           | Q1  | 0.30 | 0.44 | 0.22  | 0.20  |
|                     | Q2  | 0.07 | 0.10 | 0.05  | 0.10  |

|                                  |      |      |      |      |      |
|----------------------------------|------|------|------|------|------|
|                                  | Q3   | 0.16 | 0.42 | 0.32 | 0.59 |
| Gambier                          | GMB  | 0.02 | -    | 0.42 | 0.12 |
| Raisin+quebracho                 | GQ   | 0.07 | 0.11 | 0.25 | 0.28 |
| Quebracho+<br>Châtaignier +galle | QChG | 0.04 | 0.07 | 0.17 | 0.30 |
| Châtaignier+quebracho            | ChQ  | 0.29 | 1.29 | 1.34 | 1.46 |

Tr=traces



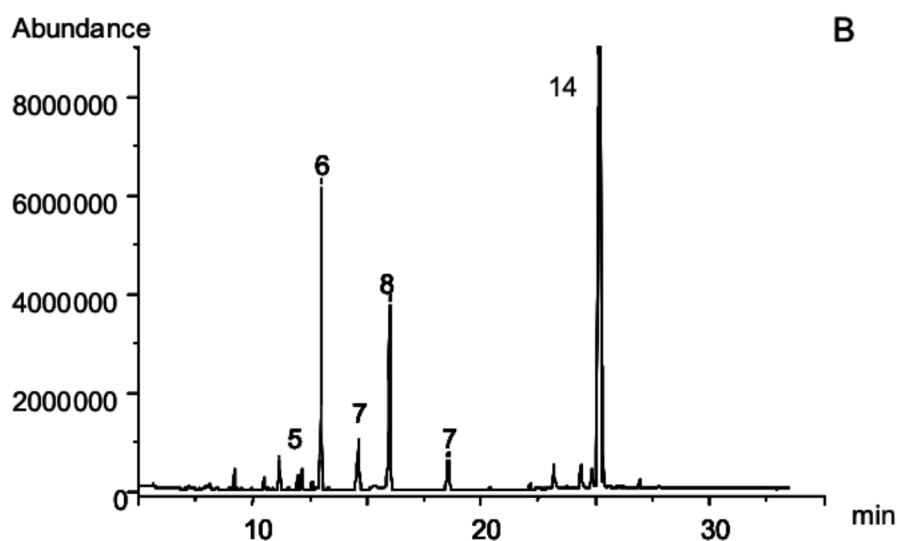
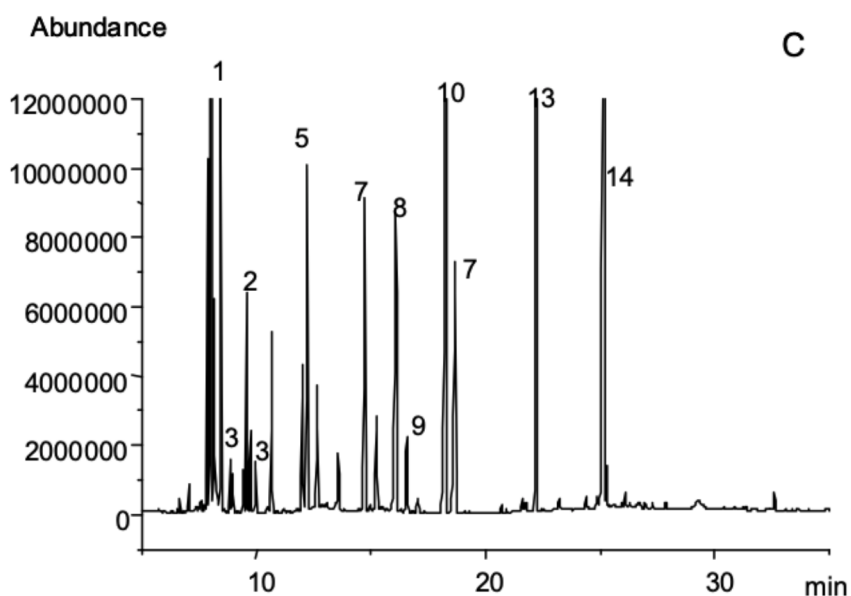
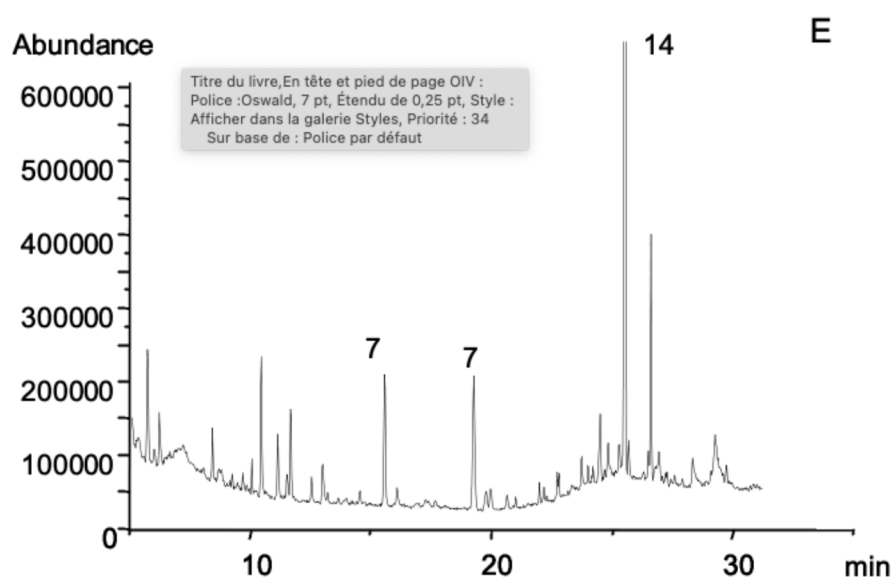
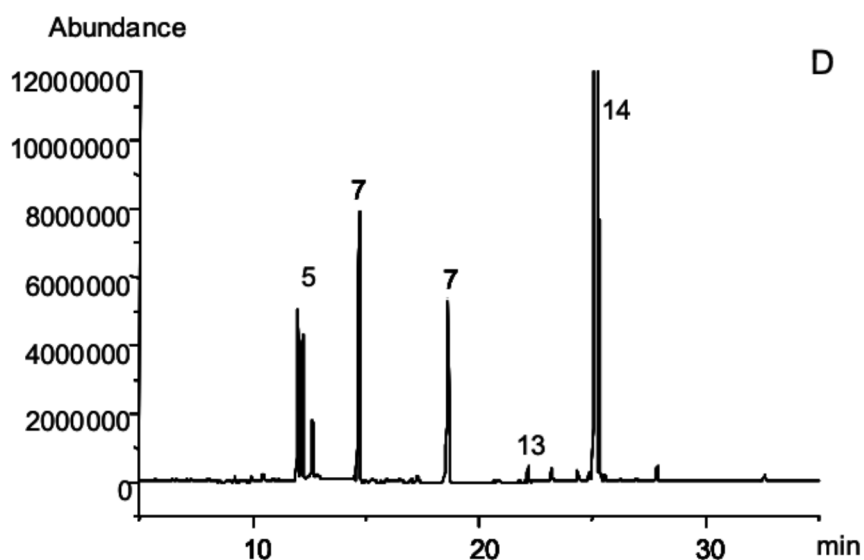
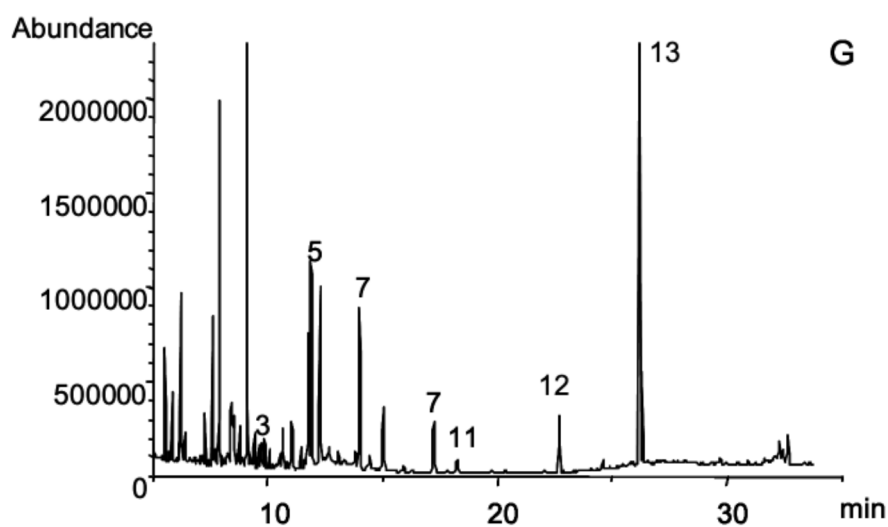
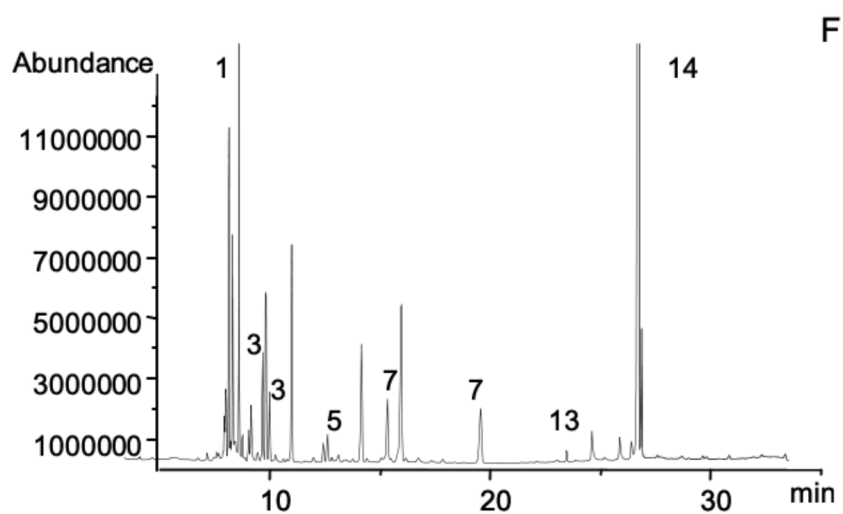
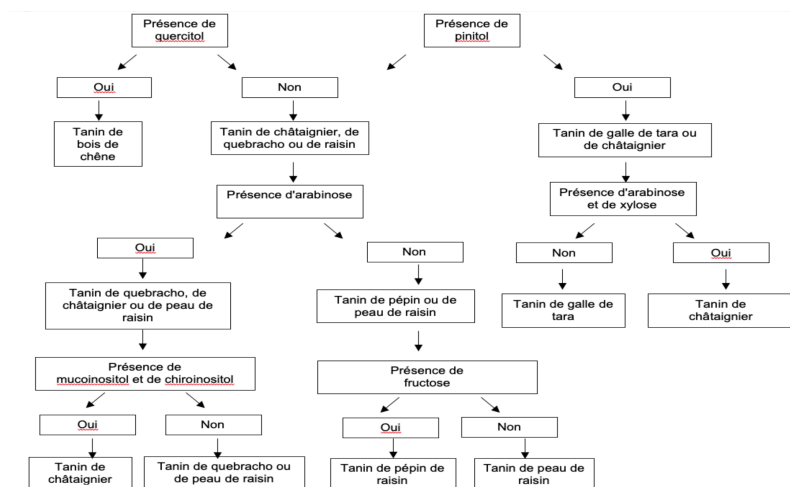


Figure 1 Profils chromatographiques en phase gazeuse des polyols et des hydrates de carbone présents dans des tanins commerciaux de A) bois de chêne, B) galle végétale, C) bois de châtaignier, D) pépin de raisin, E) pellicule de raisin, F) bois de quebracho, G) gambier. 1-arabinose, 2-arabitol, 3-xylose, 4-quercitol, 5-fructose, 6-pinitol, 7-glucose, 8-acide gallique, 9- Mucoinositol, 10-Chiroinositol, 11-Bornesitol, 12-Scylloinositol, 13-Mesoinositol, 14-Phényle- $\beta$  -D-glucoside (étalon interne)









**Figure 2.** Schéma de classification des tanins en fonction de leur composition en monosaccharides et polyols