

Extraction des composés d'arôme libres et liés d'un vin de Muscat par SPE

Isabelle LEFEBVRE-TOURNIER

Préparation du vin de Muscat en vue de l'extraction des composés d'arôme (libres et liés)

Pour une extraction correcte des composés d'arôme, il est nécessaire de diluer le vin dans 1.5 fois son volume d'eau millipore pour ramener son degré alcoolique initial (12.5% v/v) à une valeur de 5% v/v d'éthanol :

Dans un erlenmeyer, ramener 80 mL de vin à température ambiante, puis les diluer avec 120 mL d'eau millipore.

Un standard interne, le 4-nonanol est ensuite ajouté.

A l'aide d'une micro-seringue, ajouter 100 μ L d'une solution de 4-nonanol à 3,25 mg/mL dans l'éthanol.

Préparation du tampon phosphate/citrate (pH 5 ; 0,2M/0,1M)

Ce tampon sera utilisé lors de l'hydrolyse enzymatique des précurseurs d'arôme glycosylés. Préparer chaque solution séparément :

Solution A :

Préparer 10 mL d'une solution à 0,1M d'acide citrique ($M = 210,14$ g/mol) dans l'eau millipore.

Solution B :

Préparer 10 mL d'une solution à 0,2M d'hydrogénophosphate de sodium anhydre ($M = 141,96$) dans de l'eau millipore.

Conserver chaque solution séparément à 4°C. Des cristaux peuvent se reformer à basse température. Il suffit de les redissoudre à température ambiante lors de l'utilisation du tampon.

Protocole général d'extraction

Un échantillon de 100 ml de vin dilué comme décrit ci-dessus est prélevé et traité de façon à extraire les fractions libres et liées de l'arôme.

Séparation des fractions libres et liées de l'arôme

Pour l'extraction, on utilisera une cartouche de polymère SDVB (Bond Elut ENV, Varian)

La percolation est facilitée par un système de dépression (Visiprep, supelco). Les éluions se font sans dépasser 10 mmHg ; entre chaque passage de liquide, les cartouches peuvent être tirées rapidement à sec.

La cartouche est préalablement activée par passage de 15 mL de méthanol (débit lent et ne pas laisser sécher la cartouche), suivis de 15 mL d'eau millipore. Le débit doit être d'environ 1 mL/min).

Puis 100 mL d'échantillon sont percolés à 1-2 mL/min sur la cartouche.

La fraction libre est alors éluée dans un erlenmeyer de 25 mL, par 20 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane (2/1 v/v) à 2 mL/min).

La fraction liée quant à elle est éluée dans un erlenmeyer de 25 mL par 15 mL d'acétate d'éthyle.

Préparation de la fraction libre en vue de l'analyse

La fraction libre obtenue est concentrée à 36°C par rectification sur colonne Dufton jusqu'à un volume résiduel de 1 mL environ. L'ébullition est régulée par une pierre ponce ajoutée dans l'ampoule.

L'extrait est transféré dans un flacon de 2 mL qui est bouché et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique finale.

Préparation de la fraction liée en vue de l'analyse.

La fraction liée extraite à l'acétate d'éthyle est évaporée à sec sous pression réduite (bain à 45°C) puis redissoute dans un minimum de méthanol et transférer dans un tube à essai. Le méthanol est évaporé sous courant d'azote

Rq : la fraction liée peut être traité après manger mais traiter la fraction libre avant d'aller manger

3.1. HYDROLYSE ENZYMATIQUE A FAIRE EN FIN DE JOURNEE LE 1^{ER} JOUR

300 µL de tampon phosphate/citrate sont préparés en mélangeant 150 µL de solution A à 150 µL de solution B préalablement ramenée à température ambiante.

Ajouter dans ces 300µl, un mélange commercial de plusieurs enzymes glycosidasiques (AR2000, Gist Brocades) de manière à obtenir une solution à 70 mg/mL.

La fraction liée est alors reprise par 200 µL de tampon phosphate/citrate contenant le mélange commercial de plusieurs enzymes glycosidasiques. Ce mélange contient les activités enzymatiques nécessaires à l'hydrolyse des glycosides du vin. Homogénéiser au vortex et placer le tube à hydrolyse dans une étuve à 40°C pendant une nuit.

4.2. EXTRACTION DES AGLYCONES LIBERES 2ND JOUR

Laisser le tube d'hydrolyse revenir à température ambiante, puis extraire les aglycones libérés par 5 x 1 mL d'azéotrope pentane/dichlorométhane en prenant soin d'agiter à chaque fois les deux phases au vortex. Entre deux lavages, la phase organique est récupérée par pipetage à l'aide d'une pipette Pasteur. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre, puis filtrées sur un entonnoir muni d'un coton dans une ampoule à rectifier (Soulever légèrement l'entonnoir avant de verser). 10 µL de la solution à 3,25 mg/mL de 4-nonanol, standard interne, sont alors ajoutés. La concentration de l'extrait se fait par distillation sur colonne Dufton jusqu'à un volume de 400 à 600 µL, dans un bain-marie à 35-45°C. L'ébullition est régulée par une pierre ponce ajoutée dans l'ampoule. L'extrait obtenu est transféré dans un flacon de 2 mL qui est bouché et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse chromatographique finale.