

Sur l'estimation et la quantification des composés phénoliques des vins

Estimation and quantification of wine phenolic compounds

N. VIVAS, N. VIVAS DE GAULEJAC, M.F. NONIER

Tonnellerie Demptos détaché au Centre d'Etude Structurale
et d'Analyse des Molécules Organiques, Université Bordeaux I,
351, cours de la Libération - 33405 Talence.
E-mail: n.vivas@cesamo.u-bordeaux.fr

MOTS CLÉS : Polyphénols, dosage, composés phénoliques totaux, proanthocyanidols, anthocyanes, tanins, vins.

KEY WORDS: *Polyphenols, quantification, total polyphenolic compounds, proanthocyanidins, anthocyanins, tannins, wines.*

RÉSUMÉ

Nous présentons une synthèse sur les aspects analytiques concernant le dosage des polyphénols des vins. Une place particulière est réservée pour les vins rouges, dans la mesure où les polyphénols en sont des constituants majeurs et influencent largement leur qualité. Les problèmes liés à l'estimation, dans des conditions satisfaisantes, des polyphénols totaux, des proanthocyanidols et des anthocyanes, sont envisagés successivement. Il est à chaque fois rappelé les limites des méthodes et leurs contraintes techniques. Un choix motivé de protocoles adaptés à chaque dosage est proposé. Dans certains cas des améliorations de méthodes existantes sont présentées et justifiées. L'ensemble du travail constitue un appui pour le choix des meilleures techniques de dosage des polyphénols des vins. (Bulletin O.I.V., 2003, vol. 76, n° 865-866, pp. 281-303).

ABSTRACT

We presented a review on analytical aspects related to polyphenols quantification in wines. Article was focused on red wines, mainly because we found a large amounts of these compounds and they participated to numerous properties of wines and influenced quality. We analysed easier and precise conditions to evaluate total polyphenols, proanthocyanidins and anthocyanins. For each case we gave the limits, technical difficulties and sources of errors. Adapted procedures were proposed for each analysis. In some case we proposed modified methods with the justifications of changes. All these works represented a base for the choice of best polyphenolic analysis methods. (Bulletin O.I.V., 2003, vol. 76, n° 865-866, pp. 281-303).

INTRODUCTION

Les phénols se retrouvent dans tous les extraits végétaux. Le vin et ses produits dérivés n'échappent pas à cette règle, puisqu'ils sont issus du raisin. Les composés phénoliques représentent un groupe de substances déterminant pour la qualité des vins. Cela même dans les blancs où ils restent minoritaires. C'est en fait en relation avec leurs rôles; pouvant directement ou indirectement être en relation avec les qualités organoleptiques des vins. Tout d'abord, les polyphénols agissent directement en participant à la couleur et la saveur des vins; ensuite, indirectement par leurs actions sur l'évolution du vin. On peut citer, par exemple dans les blancs, des défauts olfactifs d'oxydation, subordonnés à des processus oxydatifs qui ont agi sur une partie des polyphénols solubles. Outre leur impact sur le goût et la saveur du vin, les polyphénols confèrent aux vins des propriétés nutritionnelles et pharmaceutiques.

Pour toutes ces raisons, il s'avère important de connaître à la fois le niveau de richesse polyphénolique (estimation totale) et la quantité des groupes de substances majoritaires, dont le rôle œnologique est déterminant (analyse quantitative). Ainsi, nous avons besoin d'un indice représentant l'ensemble des phénols du vin, et la teneur en tanins et en anthocyanes (pour les rouges). Mais la complexité du milieu d'analyse, la diversité des molécules concernées et l'interaction de divers facteurs rendent la démarche plus difficile qu'il n'y paraît au premier abord. L'objet de ce travail est de présenter de manière synthétique les données récentes et les bases sur l'analyse des polyphénols du vin sous un angle analytique et donc global.

Structure des composés phénoliques des raisins et des vins

Les acides phénols

Ce sont des molécules de faible masse moléculaire, que l'on retrouve dans les moûts. Les teneurs rencontrées dans les vins sont voisines de 150 mg/L dans les rouges et un peu moins dans les blancs, en raison d'une durée de contact limitée en phase solide et phase liquide de la vendange. Les structures généralement retrouvées sont cinq acides de la série benzoïque (ac. *p*-hydroxy-benzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique) et quatre de la série cinnamiques (ac. *p*-coumarique, caféique, férulique et sinapique). Quantitativement, ce sont les acides hydroxycinnamiques qui sont les plus abondants et majoritairement sous formes d'esters tartriques (fig. 1); il s'agit des acides caféoyltartrique (caftarique), *p*-coumaroyl tartrique (coutarique) et feruloyl tartrique (fétarique). Naturellement, ces différents composés se présentent sous la forme *trans*(E), parfois, plus rarement l'isomère *cis*(Z). Dans la littérature, on trouve la citation de formes minoritaires glycosylées. Les acides benzoïques sont largement représentés par l'acide gallique, également engagé dans des formes estérifiées avec les flavanols et les proanthocyanidols (proanthocyanidines galloylées). Les valeurs moyennes trouvées sur plusieurs échantillons de vins rouges sont rassemblées tableau I.

Tableau I / Table I

Composition moyenne des vins rouges en quelques polyphénols remarquables
(résultats en mg/l)Average composition of red wines in some characteristic polyphenols
(results in mg/l)

	Maxi	Mini	Moyenne
I. Acides phénols			
<i>Ac. benzoïque</i>			
Ac. p-hydroxy benzoïque	10	tr.	4
Ac. protocatéchique	35	tr.	15
Ac. gallique	140	5	80
Ac. vanillique	15	tr.	5
Ac. syringique	10	2	7
Ac. sinapique	5	tr.	2
<i>Ac. cinnamiques</i>			
Ac. caféique	35	2	12
Ac. p-coumarique	10	0.5	5
Ac. férulique	1	tr.	-
Ac. caféoyltartrique	220	10	50
Ac. p-coumaroyltartrique	30	5	10
Ac. feruloyltartrique	10	tr.	2
II. Stilbènes			
Trans-resvératrol	12	1	3
Cis-resvératrol	2	tr.	1
Trans-picéide	1	6	2
Cis-picéide	2	tr.	tr.
III. Flavanoïdes			
<i>Anthocyanes</i>			
Delphinidol-3-mG	80	5	30
Cyanidol-3-mG	40	tr.	15
Pétunidol-3-mG	50	3	20
Paéonidol-3-mG	25	tr.	10
Malvidol-3-mG	350	30	250
Acétate de malvidol-3-mG	15	2	7
p-coumarate de malvidol-3-mG	50	5	30
<i>Flavanoïls</i>			
Catéchol	300	20	130
Epicatéchol	120	5	60
Gallocatéchol	80	7	35
Epigallocatéchol	35	2	13
<i>Procyanidols dimères</i>			
Procyanidol B1	300	50	100
Procyanidol B2	100	5	30
Procyanidol B3	80	2	15
Procyanidol B4	150	10	30
Procyanidol B5	10	tr.	4
Procyanidol B6	15	tr.	2
Procyanidol B7	5	tr.	1
Procyanidol B8	2	tr.	0.5
Procyanidol A2	7	tr.	3
<i>Flavonoïls</i>			
Myricétol	15	1	4
Myricétol-3-mG	5	tr.	2
Quercétol	25	4	7
Quercétol-3-mG	20	5	10
Rutinel	20	3	12

Les stilbènes

On parle beaucoup de ce groupe de composés, dont on connaît l'une des molécules, le resvératrol (fig. 2); essentiellement pour ses propriétés anti-radicalaires et son implication sur les aspects pharmaceutique et médicinal. Généralement, les stilbènes participent à la résistance des tissus végétaux aux agressions fongiques, en particulier à *Botrytis cinerea*. On connaît également dans les rafles de raisin des formes oligomériques. Quantitativement, on en retrouve des teneurs voisines du mg/l dans les vins (Tableau I).

FIGURE 1

Structure des esters hydroxycinnamiques des raisins (R = H, ac. p-coumaroyl tartrique; R = OH, ac. caféoyl tartrique; R = OCH₃, ac. féruloyl tartrique)

Structure of grapes hydroxycinnamic esters (R = H, p-coumaroyl tartaric ac.; R = OH, cafeoyl tartaric ac.; R = OCH₃, feruloyl tartaric ac.)

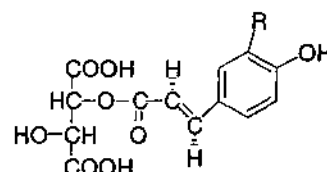
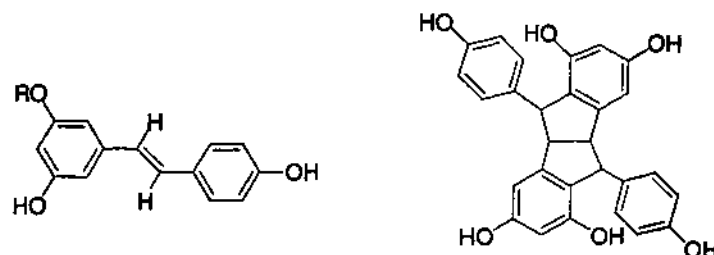


FIGURE 2

Exemples de structures de stilbènes

Examples of stilben structures



resvératrol (R=H) et picéide (R= Glucose)

Dimère de resvératrol

Les flavonoïdes

Il s'agit d'un vaste groupe de composés, dont l'importance, dans les vins rouges, est de tout premier ordre. On y trouve les substances à l'origine de leur couleur et leur saveur. Les flavanoïls, unité élémentaire constitutive des tanins condensés, font partie de cette classe. Il est utile à ce stade de préciser le choix des noms molécules. On a coutume fréquemment de nommer les anthocyanes et les tanins du raisin, respectivement d'anthocyanidines et de proanthocyanidines; alors que l'on conserve pour les

autres flavonoïdes l'appellation en «ol» (flavanols, flavonols, ...). Par exemple, on parle de flavan-3-ols et de catéchine et épicatechine, au lieu de catéchol et épicatechol. Aujourd'hui d'ailleurs ces derniers noms ne sont pratiquement plus utilisés; alors que pour les tanins condensés l'appellation en «ol» persiste dans la plupart des communications écrites ou orales. Cette déviation est en fait un anglicisme, qui bien souvent est entré dans l'écrit et le langage scientifique de l'œnologie. On parle de procyanidins et de catechin en anglais, et de procyanidines ou proanthocyanidines et de catéchine en français. Pour notre part, nous garderons l'appellation française.

Les anthocyanidols. Ils sont composés de deux mots grecs: anthos (ἄνθος) fleur et kyanos (κυανός) bleu. Ce sont des composés largement retrouvés dans le règne végétal et responsable de la coloration des fleurs, fruits et feuilles de nombreux genres. Dans les raisins, on les retrouve dans la pellicule localisés seulement au niveau des premières assises cellulaires de l'hypoderme. Chez certains cépages dits teinturiers (Alicante bouschet, Gamay fréaux), on en retrouve jusque dans les cellules de la pulpe. Au niveau des cellules, on les retrouve dans des vacuoles ou dans des organites spécialisés appelés anthocyanoplastes. Les anthocyanes du raisin sont aux nombres de cinq, distinctes les unes des autres par la substitution du noyau latéral (fig. 3), principalement sous formes glycosylées, une partie souvent moins importante est acylée; c'est-à-dire engagée dans des liaisons complexes d'esters acétiques, cinnamiques. Les cépages européens *Vitis vinifera* sont 3-monoglycosylés; quelques *Vitis* américains ou asiatiques sont 3,5-diglycosylés (*V. riparia*, *V. rupestris*, *V. amurensis*). Dans les cépages bordelais, le malvidol-3-mG est majoritaire, mais dans d'autres cépages, la répartition des anthocyanes peut être très différente. Des valeurs quantitatives moyennes, données pour plusieurs cépages sont regroupées tableau I.

Flavanes-3-ols. On retrouve dans le raisin les flavanols soit sous formes monomères soit polymérisés formant alors les tanins condensés ou proanthocyanidols. Ce groupe est majoritairement concentré dans les parties solides de la récolte (pellicules, pépins, rafles). Les flavanols et les proanthocyanidols sont localisés dans les vacuoles des cellules de l'hypoderme; mais leur répartition est plus diffuse que celle des anthocyanes. D'abord abondants dans les couches superficielles, leur présence s'atténue à mesure que l'on s'approche de la pulpe. Dans les pépins, on retrouve des polyphénols dans les couches superficielles, les rendant particulièrement accessibles et facilement extractibles. Les principaux flavanols du raisin et du vin sont dihydroxylés, il s'agit du catéchol (catéchine) et de l'épicatechol (épicatechine) et son ester gallique l'épicatechol-3-gallate; moins représentés, le gallo-catéchol et l'épigalocatéchol correspondent aux formes trihydroxylées. La figure 4 représente ces différents monomères et le tableau I les quantités moyennes retrouvées dans différents échantillons de vins. Les proanthocyanidols sont issus de la condensation des différents flavanols du raisin. On connaît mieux les formes dimériques des procyanidols, dont on peut aisément obtenir par hémisynthèse des références et qui sont dosables individuellement par chromatographie liquide (HPLC). Ils dérivent de la polymérisation des catéchols et épicatechols, partiellement galloylés et sont majoritaires dans les vins et le raisin (pellicules, pépins). Représentant de 20 à 40%, les prodelphinidols sont moins connus et se retrouvent de manière quasi spécifique dans les pellicules; ils sont issus de la polymérisation des gallo-catéchols et épigalocatéchols. La structure des proanthocyanidols est présentée figure 5

FIGURE 3

Anthocyanes monoglucosides des pellicules de raisin.
(R1 = OH, cyanidin-3-mG; R1 = OCH3, paéonidin-3-mG; R1, R2 = OH, delphinidin-3-mG; R1 = OH - et R2 = OCH3, pétunidin-3-mG; R1, R2 = OCH3, malvidin-3-mG)

Monoglucosid anthocyanins from grape skins.
(R1 = OH, cyanidin-3-mG; R1 = OCH3, paeonidin-3-mG; R1, R2 = OH, delphinidin-3-mG; R1 = OH - and R2 = OCH3, petunidin-3-mG; R1, R2 = OCH3, malvidin-3-mG)

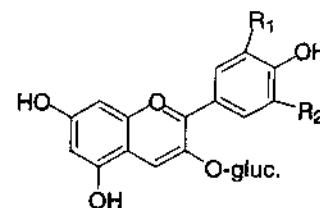


FIGURE 4

Flavan-3-ols du raisin et du vin.
(R2 = OH, catéchol; R2, R3 = OH, gallo-catéchol; R1 = OH, épicatechol; R1, R3 = OH, épigalocatéchol). A droite un épicatechol-3-gallate.

Grapes and wines flavan-3-ols.
(R2 = OH, catechin; R2, R3 = OH, gallocatechin; R1 = OH, epicatechin; R1, R3 = OH, epigallocatechin). At bottom: epicatechin-3-gallate.

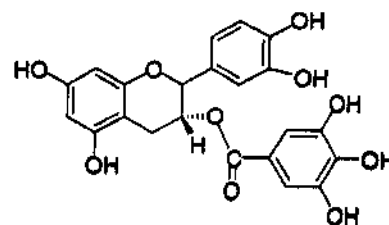
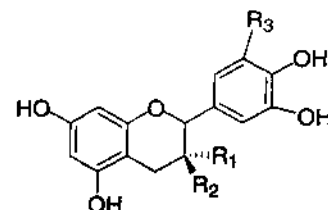
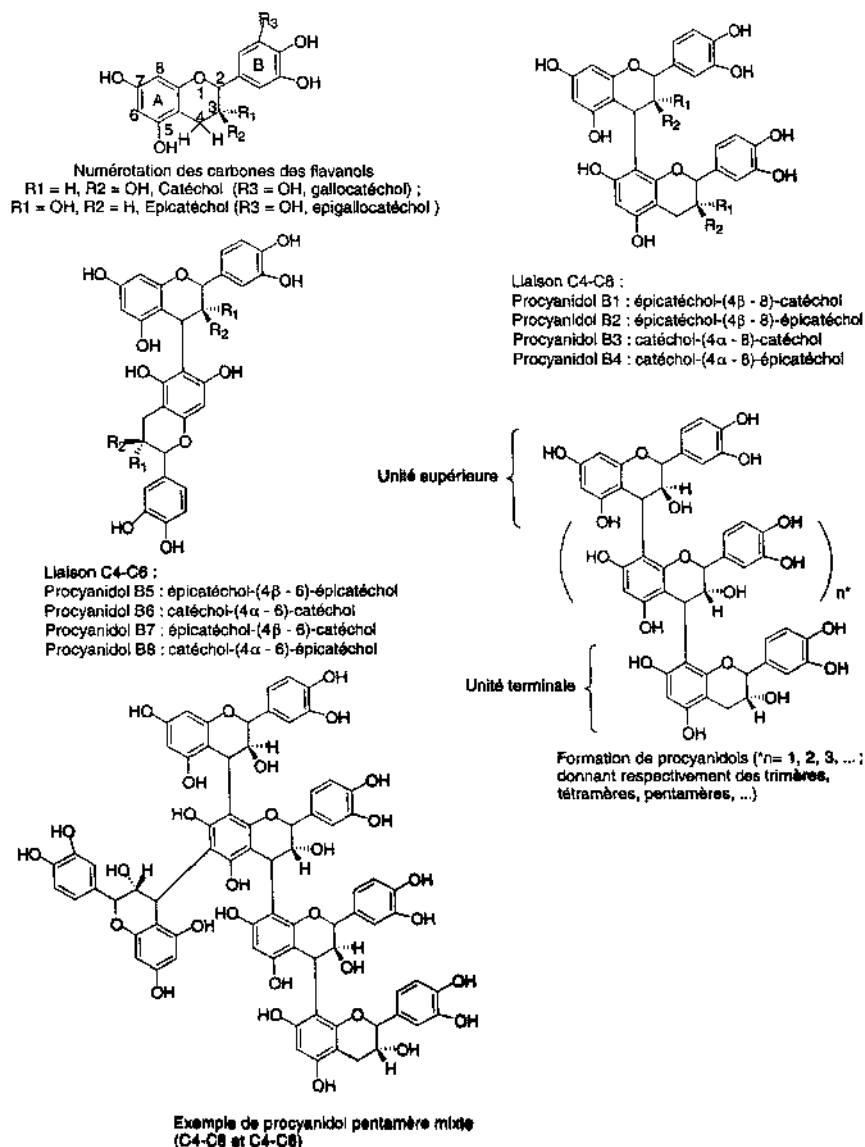


FIGURE 5

Structures des procyanidols du raisin et du vin. Pour les prodelphinidols le cycle B est trihydroxylé. L'attribution α et β sur les liaisons C4-C6 et C4-C8 correspond au proton du C4.

Structures of grapes and wines procyanidins. For prodelphinidins, cycle B is trihydroxylated. The attribution α and β on the links C4-C6 and C4-C8 corresponds to the proton of C4.



et, à titre informatif, des quantités de procyanidols dimères sont données *tableau I*. La composition moyenne de différents vins rouges et vins blancs est donnée *tableau II*.

Tableau II / Table II

Composition moyenne de moûts de raisins, de vins rouges et blancs issus du vignoble bordelais (Résultats en mg/L)

Average composition of grapes, red and white wines from Bordeaux vineyard (Results in mg/L)

	Moûts	Vins blancs	Vins rouges
Ac. benzoïques	5	10	50
Ac. cinnamiques	250	300*	300
Flavonols	tr.	10	20
Anthocyanes	-	-	600
Flavanols	tr.	10	200
Proanthocyanidols	-	150	3.500
Total	260	480	4.670

* Teneur maximale pour des vins de macération pelliculaire avec utilisation d'enzymes de macération.

Estimation globale de la teneur en polyphénols

Historiquement, les différents travaux portant sur l'évaluation des polyphénols totaux des vins se sont rapidement orientés vers un indice global. Très tôt des méthodes titrimétriques d'oxydation des substances réductrices contenues dans une prise d'essai de vin ont été choisies. Le permanganate de potassium s'est alors imposé pour définir un indice sans unité soit en équivalent g ou mg/L d'une poudre tannique de référence, purifiée au laboratoire. Mais la méthode est délicate, puisque le virage de fin de réaction du carmin d'indigo est progressif (évolution vers le jaune «paille»), elle est non spécifique des polyphénols et reste fortement liée à l'appréciation du manipulateur. L'indice de Folin Ciocalteu (indice FC) est plus commode car fondé sur une réaction colorée dont on mesure l'intensité en spectrophotométrie; utilisant là aussi les propriétés oxydantes du réactif Folin Ciocalteu (acide phosphotungstique et phosphomolybdique). Enfin, un troisième indice actuellement largement employé dans les laboratoires, consiste à mesurer dans l'UV à 280 nm l'absorbance caractéristique des électrons délocalisés des cycles benzéniques des polyphénols. La méthode a l'avantage d'être simple (une dilution convenable de l'échantillon au 1/100 est suffisante) et directe (lecture au spectrophotomètre de l'absorbance à 280 nm); elle ne requiert aucun réactif ni attente pour permettre un développement de la réaction. A titre de comparaison, nous présentons *tableau III* des analyses réalisées sur différents vins avec ces méthodes. Pour des raisons évidentes de précision et de reproductibilité, nous écartons dans la suite du travail l'indice de permanganate.

Tableau III / Table III

Comparaison de différents indices de phénols totaux sur vins blancs et rouges
 Comparison of some total phenols index for white and red wines

	Méthodes manuelles			Méthodes automatiques
	Titrimétrique	Spectrophotométrique		Spectrophotométrique
	Indice de permanganate	Indice de Folin-Ciocalteu	Indice D.O. 280 nm	Indice D.O. 280 nm
<i>Vins rouges</i>				
n° 1	31	40	44	46
n° 2	54	62	68	71
n° 3	26	31	37	38
<i>Vins blancs</i>				
n° 4	15	11	7	6
n° 5	21	6	4	3
<i>Vin n° 1</i>				
répétition a	31	40	44	46
b	45	37	42	45
c	32	39	43	46
d	26	42	44	46

L'indice de Folin Ciocalteu

La réaction est fondée sur la réduction en milieu alcalin du mélange acides phosphotungstique et phosphomolybdique par les phénols en oxydes de tungstène et de molybdène de couleur bleue. Sur ce principe deux réactifs ont été mis au point, le Folin Denis et le Folin Ciocalteu (FC) qui contient en plus du sulfate de lithium et de l'acide chlorhydrique; pour des raisons pratiques, d'intensité de réaction, de stabilité et de non formation de trouble c'est le FC qui a été retenu.

Il existe plusieurs protocoles dérivant de la publication originale de Singleton et Rossi (1965). En particulier, la longueur d'onde choisie pour mesurer l'intensité de la réaction colorée (bleue) varie selon les références de 700 à 760 nm. En réalité cette divergence est liée aux performances des spectrophotomètres UV/Visible qui couvrent plus ou moins bien la zone du proche infrarouge. Ainsi, il est correct de mesurer l'absorbance à 750 nm, correspondant au maximum de coloration dans la plus grande majorité des cas et à une zone où la valeur est relativement stable. Blouin *et al.* (1972) ont étudié de très près les différents facteurs pouvant affecter la réaction. Il s'avère qu'à température ambiante la réaction est lente. Le chauffage à 70°C durant 20 mn permet d'obtenir le maximum de la réaction correspondant au maximum d'absorbance à 750 nm; stable durant plusieurs minutes.

Le protocole retenu est le suivant: dans une fiole de 20 mL, on mélange 0,2 mL de vin (dilué au préalable au 1/5 ou 1/10 pour les vins rouges), 1 mL de réactif de FC et qsp 20 mL de Na₂CO₃ à 4%. Après 20 mn à 70°C, on mesure l'intensité de la couleur formée à 750 nm. L'indice de FC correspond à la D.O. x dilution. Dans certains cas, on peut être amené, pour des raisons de simplification, à éliminer l'étape d'incubation à 70°C, dans ce cas, et pour obtenir des résultats approchés cohérents, il est souhaitable d'attendre 60 mn avant de mesurer l'absorbance à 750 nm.

Cependant, la méthode n'est pas spécifique des composés phénoliques; elle concerne sans discernement toutes substances potentiellement oxydables. Ainsi, comme l'a montré Moutounet (1981), sur des moûts modèles, le sucre et le SO₂ agissent avec le réactif pour donner une valeur de l'indice par excès pouvant même dans certains cas augmenter de 100% la valeur. D'autre part le mélange de substances interférentes agit en synergie pour amplifier l'erreur d'estimation. Pour cette raison, il est préférable d'écarter l'emploi de l'indice de FC sur les moûts (riches en sucres et parfois en SO₂), sur les vins blancs et la majorité des vins rosés, assez pauvres en polyphénols. On réservera donc la méthode aux vins riches en polyphénols tels que les vins rouges.

L'indice de polyphénols totaux à 280 nm

Cet indice est très simple, il utilise l'absorbance caractéristique des noyaux benzéniques des polyphénols à 280 nm. La réalisation est simple, puisqu'il suffit de diluer convenablement les vins dans de l'eau et mesurer l'absorbance à 280 nm. L'indice (IPT) correspond à D.O. x dilution. Généralement, les vins rouges sont dilués au 1/100 et les blancs au 1/10.

Mais la méthode présente un certain nombre de causes d'erreurs. Globalement, ces erreurs restent anecdotiques et font que ce mode d'estimation des phénols totaux est le plus intéressant. Dans la zone de longueurs d'ondes choisie, il existe différents autres groupes chimiques, minoritaires dans les vins secs et un peu plus abondants dans les vins issus de raisin pourri noble, qui répondent; par exemple à 270 nm les composés carbonyles, à 285 nm les oxodiènes et peuvent affecter la valeur de l'indice. Les acides hydroxycinnamiques ont un maximum d'absorbance à 320 nm, leur part dans l'ensemble des polyphénols totaux est alors sous-estimée. Ceci représente un écart négligeable dans les vins rouges où proanthocyanidols et anthocyanes sont largement majoritaires; en revanche, dans les moûts et les vins blancs l'erreur par défaut est appréciable (Tableau II). On aurait probablement utilisé à distinguer dans les moûts et les vins blancs les phénols totaux (Absorbance à 280 nm) et les acides hydroxycinnamiques (Absorbance à 320 nm). Pour les vins blancs et particulièrement ceux élevés sur lies, l'enrichissement en composés azotés est à l'origine d'une augmentation de l'IPT, comme on peut le voir sur le tableau IV (vins 3 et 4). Pour tenir compte de cette erreur par excès, on calcule simplement l'IPT des vins blancs de la façon suivante: **IPT = Absorbance à 280 - 0,3 (Absorbance à 280)**. La correction permet d'obtenir des résultats nettement plus précis et en relation avec la fraction phénolique du vin (Tableau V). Pour les vins rouges, ce type d'erreurs par excès représente moins de 10% de la valeur de l'indice (4 à 7%) et la correction n'est pas nécessaire.

Tableau IV / Table IV

Incidence du mode de logement et de la présence de lies sur la répartition de la D.O. 280 nm (Valeur de D.O. 280 corrigée du facteur de dilution)

Influence of the conditions of storing and the presence of lees on the A 280 nm composition (Value of A 280 considering the factor of dilution)

Vins	Fermen- tation alcoolique	Elevage	Lies	D.O. 280 Total	D.O. 280		% D.O. 280 phénolique
					non Phénolique #	Phénolique *	
1	Cuve	Cuve	Non	5,1	1,8	3,3	64
2	Cuve	Barrique	Non	7,5	3,1	4,4	58
3	Barrique	Barrique	Non	6,3	2,4	3,9	62
4	Barrique	Barrique	Oui	7,8	3,7	4,1	52

Dépôt de 10 mL de vin sur une colonne de pvpp activée (10 cm de gel, colonne 20 x 2 cm) mesure D.O. 280 nm de l'éluat à l'eau ramenée à 10 mL.

* D.O. 280 totale - D.O. 280 fraction non phénolique.

Tableau V / Table V

Comparaison de l'indice de polyphénols totaux (IPT) mesuré et calculé pour tenir compte de la participation des composés azotés des vins blancs à la D.O. 280 nm

Comparison of total phenol index (IPT) measured and calculated to estimate the participation of nitrogenous compounds on A 280 nm of white wines

Vins	D.O. 280 ¹	IPT		Différence en %
		Calculé ²	mesuré ³	
1	6,5	4,5	5,2	13
2	5,3	3,7	4,1	9,7
3	7,4	5,2	5,1	2
4	4,2	2,9	3,2	9,4
5	5,2	3,6	4,3	16
6	5,1	3,6	3,8	5,2
7	8,2	5,7	6,2	8

¹ corrigé du facteur de dilution.

² D.O. 280 totale - 0,3 (D.O. 280 totale).

³ D.O. 280 totale - D.O. 280 fraction non phénolique.

Pouvoir réducteur total

Le complexe $\alpha\alpha'$ -dipyridyle ferrique ($DPFe_3$) oxyde les substances réductrices et donne l' $\alpha\alpha'$ -dipyridyle ferreux de couleur rouge absorbant à 510 nm (Chapon *et al.*, 1971). Le réactif n'agit pas sur les sucres et les protéines et peu sur le SO_2 . Dans une cuve du spectrophotomètre thermostatée à 25°C, on mélange 3,9 mL de dipyridyle ($\alpha\alpha'$ -dipyridyle 0,1 g, H_2SO_4 0,1N 8 mL, eau distillée qsp 100 mL), 0,1 mL de sulfate ferrique (0,125 g, HCl concentré 0,4 mL, eau distillée qsp 100 mL) et 100 μ L de vin. Par convention, on lit à 510 nm l'absorbance après 3 mn.

Méthodes néphélométriques

Ces méthodes sont assez peu utilisées en œnologie; elles sont fondées sur la formation d'associations, plus ou moins stables, donnant un trouble mesuré par néphélométrie. Les résultats peuvent rester des indices ou sont comparés à des solutions pures de tanins. Les agents choisis sont peu spécifiques et agissent indifféremment sur une large gamme de polyphénols, avec peut-être une meilleure affinité pour les tanins.

Méthode à la cinchonine. Le protocole adapté au vin est celui de Chapon *et al.* (1965). On place 4 mL d'une solution saturée de sulfate de cinchonine, contenant 200 mg/L de gélatine, pour stabiliser le trouble, dans la cuve d'un néphélomètre équipé d'une agitation magnétique. Puis on injecte lentement (1,5 à 1,8 mL/h) le vin dilué au 1/2. On obtient au cours du temps une courbe dont on mesure la pente. On pratique à l'identique sur une solution de tanins galliques (Merck, ref: DAB6) à 1 g/L. Le rapport des pentes des deux courbes donne un indice représentant à la fois la richesse tannique du vin et son astringence.

Méthode à la polyvinylpyrrolidone (PVP) (Chapon *et al.*, 1961). On injecte lentement (1,5 à 2 mL/h) une solution de PVP (K90) à 400 mg/L dans une prise d'essais de 4 mL (50 μ L de vin rouge, ou 1 mL de blanc, 0,8 mL de $(NH_4)_2SO_4$ saturé et de l'eau acidifiée psp 4 mL (1‰ d'ac. acétique). Le $(NH_4)_2SO_4$ est employé pour diminuer la solubilité du complexe polyphénols/PVP. La quantité de PVP pour atteindre le trouble maximum correspond à la quantité totale de polyphénols du vin.

Dosage des proanthocyanidols

Les proanthocyanidols, communément appelés tanins ou tanins condensés, peuvent être dosés par des méthodes chimiques globales découlant de principes employés par les polyméristes. Il s'agit alors de dépolymériser les tanins et de quantifier les monomères formés. On peut aussi analyser les substances individuellement par HPLC. D'autres méthodes chimiques existent, fondées sur la démixtion ou la précipitation, cependant elles utilisent des réactions non spécifiques et sont entachées de larges erreurs. D'autres méthodes, parfois utilisées font appel à la substitution de nucléophiles convenablement choisis, généralement des aldéhydes phénoliques; le plus connu

étant la vanilline. La voie de dosage la plus commune est celle fondée sur la dépolymérisation acide et la mesure de la coloration rouge issue de la formation d'anthocyanidols.

Réaction de dépolymérisation acide à chaud, réaction de Bate-Smith (1954)

La méthode est fondée sur la dépolymérisation oxydative à chaud, en milieu acide minéral, des proanthocyanidols et formation d'anthocyanidols absorbant, selon leur nature, dans le rouge entre 500 et 550 nm: le delphinidol issu de prodelphinidols et le cyanidol de procyanidols, ont un $\lambda_{\max}$ respectivement de 546 nm et 526 nm, mesurés dans du méthanol à 0,01% d'HCl.

Plusieurs méthodes coexistent. L'hydrolyse en milieu aqueux et chlorhydrique de Masquelier *et al.* (1959), généralisée par Ribéreau-Gayon et Stonestreet à l'œnologie (1964), ou la butanololyse en milieu chlorhydrique et en présence de sels ferreux (FeSO_4) comme catalyseurs (Govindarajan et Mathew, 1965). Plus récemment, une étude très détaillée des meilleures modalités de conversion des procyanidols et prodelphinidols en cyanidol et delphinidol a été publiée par Porter *et al.* (1986). Pour différentes raisons, la seconde méthode semble plus performante pour le dosage des proanthocyanidols du vin. Sur le *tableau VI*, nous avons comparé les résultats obtenus avec les deux méthodes, dans les conditions suivantes:

- Méthode I (hydrolyse à chaud + HCl): on prépare deux tubes par dosage contenant 4 mL de vin ou de solution riche en tanins dilués au 1/50, 2 mL d'eau distillée, 6 mL d'HCl concentré (12N). L'un est chauffé 30 mn, 100°C, l'autre non. Avant de lire l'absorbance à 550 nm, on ajoute dans les deux tubes 1 mL d'EtOH, pour améliorer la solubilité des anthocyanes formées. La coloration formée est soustraite à la coloration du tube témoin non chauffé et les résultats sont donnés par rapport à une courbe étalon réalisée à partir d'une solution de procyanidols préparés au laboratoire (extrait à l'acétate d'éthyle, d'une macération hydroalcoolique de pépins de raisins).
- Méthode II (Butanololyse à chaud + HCl + FeSO_4): pour les besoins œnologiques, nous avons adapté la méthode originelle employée sur des extraits végétaux riches en polyphénols: En utilisant deux tubes, 0,5 mL de vin ou de solution riche en tanins dilués au 1/25 dans l'eau (pour limiter l'apport d'eau à moins de 10% et à plus de 5%, au-delà de 10% on note une diminution très sensible de la D.O. et donc de la sensibilité de la mesure, mais en deçà de 5% l'intensité de la couleur est également affectée), 7 mL de Butanol/HCl (95/5, v/v) et 0,2 mL de fer (20 g/L FeSO_4 , dans HCl 2M). Il est à noter que le fer ferreux donne de meilleurs résultats que le ferrique, qui en outre provoque un effet bathochrome sur le maxima d'absorbance (550 nm avec le Fer (II), 560 nm avec le Fer(III)). Un des deux tubes est chauffé 40 mn à 95°C. Pour la quantification, on pratique comme pour la méthode I.

On remarque (*Tableau VI*), en utilisant ces deux protocoles que la méthode II est beaucoup plus sensible, précise et reproductible. En outre, la mesure d'absorbance dans la méthode I se pratique à 550 nm alors que le maximum est nettement positionné à 520 nm. Enfin, en comparant les

Tableau VI / *Table VI*

Comparaison des performances des méthodes de dosage des proanthocyanidols des vins par réaction de Bate-Smith

Comparison of performances of quantification methods of wine procyanidins by Bate-Smith reaction

.	Méthode I Hydrolyse acide			Méthode II Butanololyse acide + sulfate de fer		
	$\lambda_{\max}$	Δ D.O. ¹	[C] g/L	$\lambda_{\max}$	Δ D.O. ¹	[C] g/L
Extrait de pépins (0,1 g/L)	520	0,47	0,07	552	2,2	0,12
Vins rouges						
1	519	18,8	2,8	548	78,1	3,5
2	518	26,3	4,2	550	104,9	4,6
3	520	15,6	2,1	551	57,4	2,6
4	520	19,7	3,5	548	84,6	3,8
Vins blancs						
5	520	nm ³	–	550	1,2	0,05
6	519	nm	–	551	0,8	0,03
7	519	0,62	0,08	551	2,8	0,13

¹ Après correction du facteur de dilution.

² Par rapport à une préparation de procyanidols oligomères de pépins extraits à l'acétate d'éthyle.

³ non mesurable.

résultats obtenus sur des poudres de proanthocyanidols, la méthode I donne des résultats par défaut, laissant supposer que la réaction soit est incomplète, soit provoque la formation de produits secondaires n'absorbant pas dans la zone 500-550 nm (*Figure 6*).

Dans le cas des vins blancs où la teneur en tanins est souvent inférieure à 0,15 g/L, il est préférable d'adsorber au préalable les proanthocyanidols sur de la PVPP avant de pratiquer la butanololyse. On obtient alors des absorbances 15 à 20 fois plus élevées que par dosage direct. On procède comme suit: Mélange 0,5 g de PVPP activée à 5 mL de vin et 20 mL d'eau; après 10 mn, la résine est centrifugée et lavée à trois reprises par 10 mL d'eau distillée. Après la dernière centrifugation, la résine est mise en suspension dans 0,5 mL d'eau distillée, versée dans un tube à hydrolyse, on rajoute alors les réactifs nécessaires et il est procédé comme pour la méthode II.

Pour les vins renfermant des quantités élevées de sucres réducteurs, il est alors indispensable de recourir à l'adsorption des proanthocyanidols sur PVPP avant de réaliser leur dosage. C'est particulièrement le cas des Porto, Rivesalt, Maury, ...

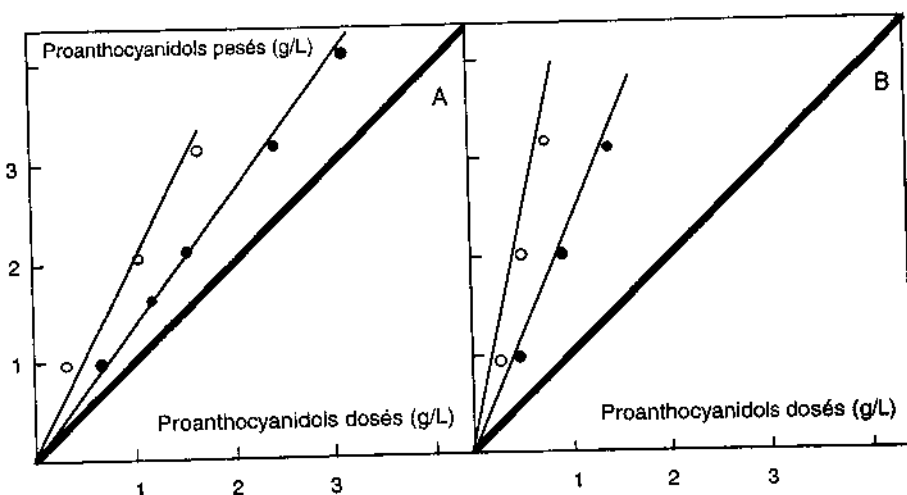
FIGURE 6

Influence du niveau de polymérisation des procyanidols et de la méthode de dosage sur la valeur des résultats.

A: procyanidols oligomères; B: procyanidols polymérisés
Les procyanidols de pépins sont obtenus par fractionnement sur gel TSK après macération hydroalcoolique (ronds vides, méthode I d'hydrolyse; ronds pleins, méthode II de butanolysé avec fer). Le trait gras indique la courbe théorique de correspondance entre quantités dosées et pesées.

Influence of polymerisation level of procyanidins and quantification methods on the value.

A: procyanidin oligomers; B: polymerised procyanidins
Procyanidins of seeds are obtained by fractionation on TSK gel after hydroalcoholic maceration (empty circles, method I of hydrolysis; full circles, method II of butanolysis with iron). Thick line indicates the theoretical curve of relation between measured and weighted quantities.



Réaction de dépolymérisation par thioacidolyse

La méthode est fondée sur le clivage thiolique des liaisons intermonomériques flavanoliques (LIF) des proanthocyanidols en milieu acide et à chaud. La rupture de la LIF provoque la formation d'un carbocation sur lequel se fixe un nucléophile (un thiol, éthanethiol, toluène- α -thiol). Ainsi, les unités supérieures et intermédiaires se présentent sous la forme de thioéthers, les unités terminales restant sous la forme de flavanols libres. Les monomères libérés sont alors séparés et dosés par HPLC (Rigaud *et al.*, 1991). On peut ainsi quantifier séparément les procyanidols des prodelfinidols, calculer un taux de galloylation et une masse moléculaire moyenne. Cependant, il n'est pas possible de réaliser par cette méthode un dosage direct sur le vin; la

très difficile. Il est alors préférable de préfractionner le vin traité convenable, sur TSK ou Fractogel, avec le risque de n'obtenir qu'une part seulement des proanthocyanidols totaux du vin. La méthode reste longue, fastidieuse et nécessite à la fois un équipement de chromatographie basse pression et d'HPLC. Elle n'est donc pas applicable pour le dosage courant des tanins du vin. Elle garde tout son intérêt dans le cadre d'un travail de recherche (Prieur *et al.*, 1994; Sarni-Manchado *et al.*, 1999).

Analyse des procyanidols par HPLC en phase inverse

Il est envisageable de doser les proanthocyanidols par HPLC. La méthode nécessite cependant un certain nombre de précautions. D'abord dans le vin, la grande diversité de substances phénoliques présentes charge le chromatogramme et rend difficile l'attribution des pics; il est alors indispensable de

Tableau VII / Table VII

Dosages des proanthocyanidols totaux par butanolysé chlorhydrique et des procyanidols par HPLC en phase inverse, pour différents échantillons de vins
Quantification of total proanthocyanidins by chlorhydric butanolysis and procyanidins by HPLC reverse phase, for different samples of wines

Proanthocyanidols				Procyanidols ^{1,2} b (mg/L)								Rapport b/a	
totaux (g/L)													
	a	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	A2	C1	Total	
Merlot noir													
1	3,6	41	90	14	14	13	10	-	2,6	1,3	-	186	0,05
2	2,5	8,2	30	4,0	5,1	3,2	4,0	0,8	0,8	0,4	0,5	57	0,02
3	3,2	25	50	10	12	4,1	2,0	6,1	1,3	1,0	6,4	118	0,04
4	2,9	14	36	5,0	5,7	9,4	0,7	1,4	1,4	0,7	2,1	83,5	0,03
5	3,1	16	44	7,0	3,6	22	6,6	2,3	2,4	1,7	9,2	115	0,04
6	2,7	16	36	5,8	0,5	9,6	0,4	-	-	0,8	-	69,1	0,02
Cabernet sauv.													
1	3,4	25	41	10	8,1	9,5	4,4	3,1	1,9	0,8	3,6	107,4	0,03
2	2,3	1,7	7,1	0,5	-	3,2	2,0	1,3	0,3	0,7	0,7	17,5	0,01
3	3,8	18	28	4,3	4,3	7,6	5,7	1,2	0,8	1,8	1,4	73,1	0,02
4	2,4	3,8	10	2,2	2,1	5,8	3,6	0,6	0,4	0,9	2,7	32,1	0,01
5	2,6	4,5	10	2,4	-	4,8	2,3	-	-	0,3	-	24,3	0,01
Moyenne	2,9											80,3	0,025

¹ Analyse par HPLC de la fraction correspondant aux procyanidols, après séparation sur gel TSK d'un concentrat de vin.

² Série B: dimères, A: dimères, série C: trimères.

passer par une étape préalable de fractionnement sur gel en basse pression. Ensuite, il n'existe pas d'étalon de tous les proanthocyanidols du vin, c'est particulièrement vrai pour les prodelphinidols; ce qui rend difficile l'identification des pics. D'autre part, nous ne possédons des produits de référence que pour les procyanidols dimères, quelques trimères; pour tous les autres tanins il n'en existe pas; leur préparation par hémisynthèse ou leur purification ne sont pas envisageables pour des applications analytiques (étapes longues et faibles rendements). Enfin, sur le plan purement chromatographique, la séparation des proanthocyanidols sous la forme de pic individualisé n'est satisfaisante que pour les dimères et dans une moindre mesure les trimères; au-delà, les substances sont regroupées sous la forme de massifs non résolus par les colonnes actuelles les plus performantes (colonne de silice greffée C18). L'augmentation de la longueur des colonnes, ou la succession de ces colonnes placées en série n'améliorent pas la résolution des chromatogrammes. Certaines des formes les plus polymérisées sont retenues partiellement sur la précolonne, sous-estimant la quantité réelle de tanins. Un exemple de l'utilisation de l'HPLC pour étudier les tanins des vins et les problèmes analytiques rencontrés sont donnés par Saint Cricq de Gaulejac *et al.* (1998).

A titre d'exemple, nous présentons *tableau VII*, une série d'analyses comparatives réalisées par HPLC après fractionnement sur gel TSK et par dosages totaux utilisant la butanolyse. Les résultats montrent que le dosage des procyanidols dimères ne représente pas plus de 1 à 5% des tanins totaux. Dans des cas extrêmes, nous atteignons 12% du résultat du dosage des tanins totaux. Ceci illustre clairement les limites analytiques de la méthode, dans l'état actuel des connaissances et des performances du matériel disponible.

Méthodes colorimétriques utilisant des additions nucléophiles

La réactivité des sommets nucléophiles des noyaux phloroglucinols avec les aldéhydes protonés en milieu fortement acide est une propriété connue depuis longtemps. En fonction de l'aldéhyde choisi, le complexe formé est insoluble et précipite (l'aldéhyde formique, Singleton, 1974), ou possède une coloration spécifique, mesurable par spectrophotométrie, (Vanilline «V», Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1964; Diméthylamino-cinnamaldéhyde «DMACH», Vivas *et al.* 1994). Plus le milieu contient des tanins et plus le poids de précipité ou l'intensité de la réaction colorée sont élevés. La réaction est aussi affectée par le degré de polymérisation des proanthocyanidols. Plus le degré de polymérisation est élevé, moins les sites nucléophiles des tanins sont accessibles à l'aldéhyde. Dans le cas de réaction colorée, l'intensité de la couleur est d'autant plus faible que le degré de condensation des tanins est élevé. Ainsi, ce principe a été employé pour la vanilline et le diméthylaminocinnamaldéhyde à la détermination du niveau de polymérisation des proanthocyanidols (PA) du vin en rapportant la valeur de l'absorbance à un gramme de tanins (V/PA; DMACH/PA).

La vanilline, en milieu acide donne des complexes rouges, mais cet aldéhyde est assez peu spécifique des tanins du vin et le développement de la réaction est peu reproductible. Le diméthylaminocinnamaldéhyde est, par contre, plus spécifique des noyaux phloroglucinols et peut être employé pour

donner une estimation de la concentration en proanthocyanidols. Mais par ce que affectées par le niveau de polymérisation, ces méthodes doivent être écartées pour des essais de quantification.

Dosage des anthocyanes

Les anthocyanes sont responsables d'une partie importante de la coloration, surtout chez les vins jeunes. C'est sous la forme d'ions oxonium, présentés *figure 3*, que les anthocyanes ont une coloration rouge. Cependant, cette forme est instable et peut évoluer vers d'autres formes dont certaines sont incolores et d'autres bleues-violacées. Au pH du vin toutes ces formes coexistent en diverses proportions. Les différentes méthodes de dosage restent fondées sur deux propriétés remarquables de ces substances (Ribéreau-Gayon et Stonestreet, 1965). D'une part, la modification de leur coloration sous l'effet de la variation du pH; en particulier le déplacement des équilibres vers la forme oxonium rouge par forte acidification. D'autre part, la décoloration totale des anthocyanes libres en présence de SO₂, par formation de combinaisons bisulfite incolores. Comme pour les proanthocyanidols, l'HPLC permet également de réaliser des dosages d'anthocyanes (Wulf et Nagel, 1978).

Dosage direct par mesure de l'absorbance à 520 nm

Il s'agit de la méthode la plus simple, qui consiste à mesurer l'absorbance à 520 nm d'échantillons de vins et de la comparer à une gamme d'étalon réalisée avec des solutions d'anthocyanes purifiées à partir de pellicules de raisins à maturité. Mais bien que séduisante, la méthode se heurte à la variabilité de la couleur rouge en fonction des valeurs de pH des vins, d'autant plus, qu'au pH des vins (3.5-4.0) la forme rouge est très largement minoritaire et les corrections à apporter sont importantes. En outre, il faudrait tenir compte du SO₂ libre et éventuellement des combinaisons tanins-anthocyanes. La méthode n'est donc pas à retenir.

Dosage par les méthodes utilisant la différence de pH et la décoloration au SO₂

La méthode, par différence de pH, consiste à abaisser le pH à une valeur voisine de 0,5, pour déplacer l'équilibre vers la forme oxonium rouge; puis mesurer la densité optique de la solution à 520 nm, correspondant au maximum d'absorbance. On soustrait à la valeur, celle obtenue sur un témoin à pH 3,5. Mais la méthode a été rejetée très tôt par Ribéreau-Gayon et Stonestreet (1965), lui préférant la méthode au bisulfite moins sensible aux conditions de milieu. En particulier dans le tube témoin à pH 3,5, la valeur de l'absorbance est affectée par le SO₂ libre du vin et la coloration de la solution est influencée par des interactions avec les ions métalliques.

Pour la méthode de décoloration au SO₂, on procède comme suit: on mélange 1 mL de vin, 1 mL d'éthanol à 0,1% d'HCl et 20 mL d'HCl à 2%. Ensuite, dans deux tubes, il est déposé 10 mL du mélange précédent. Dans

FIGURE 7

Chromatogramme HPLC en phase inverse d'un vin de Cabernet sauvignon, avant fermentation malolactique. Séparation sur colonne C18, enregistrement à 520 nm.

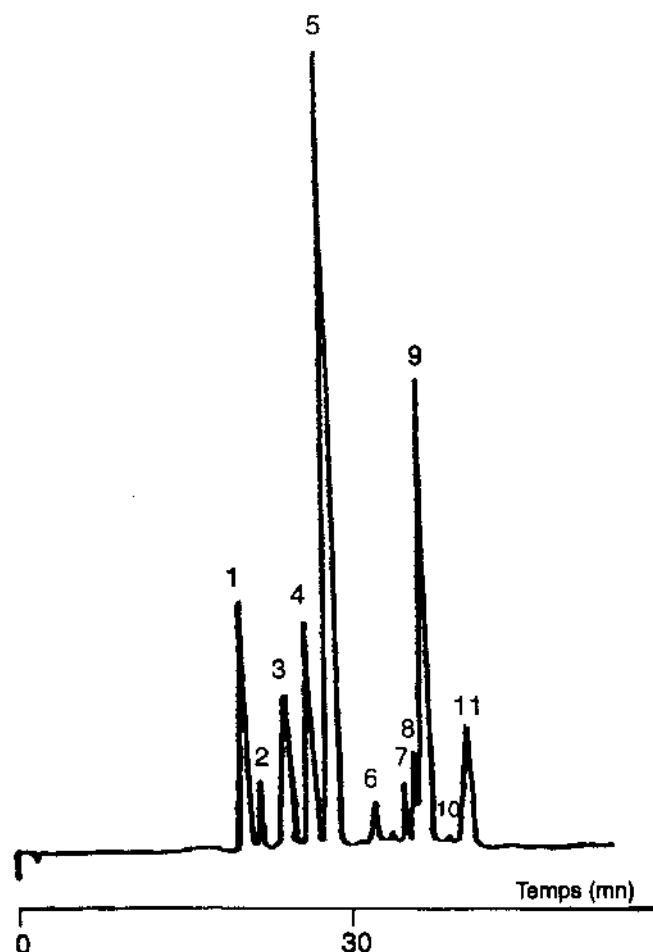
(Pics 1-5 anthocyanes-3-mG; pics 6-11 anthocyanes acylés).

Identification des pics: 1, delphinidol-3-mG; 2, cyanidol-3-mG; 3, pétunidol-3-mG; 4, paeonidol-3-mG; 5, malvidol-3-mG; 6, delphinidol-3-mG acétate; 7, pétunidol-3-mG acétate; 8, paeonidol-3-mG acétate; 9, malvidol-3-mG acétate; 10, paeonidol-3-mG coumarate; 11, malvidol-3-mG coumarate.

HPLC chromatogram in reverse phase of a Cabernet sauvignon, before malolactic fermentation. Separation on C18 column, recording at 520 nm.

(Peaks 1-5 anthocyanins-3-mG; peaks 6-11 acylated anthocyanins).

Identification of peaks: 1, delphinidin-3-mG; 2, cyanidin-3-mG; 3, petunidin-3-mG; 4, paeonidin-3-mG; 5, malvidin-3-mG; 6, delphinidin-3-mG acetate; 7, petunidin-3-mG acetate; 8, paeonidin-3-mG acetate; 9, malvidin-3-mG acetate; 10, paeonidin-3-mG coumarate; 11, malvidin-3-mG coumarate.



le tube *a*, on ajoute 4 mL d'eau distillée et dans le *b* 4 mL de SO₂ concentré (37.5%). Après 20 mn, pour permettre une décoloration complète des anthocyanes, surtout pour les vins âgés, on mesure l'absorbance à 520 nm dans les deux tubes. La concentration en anthocyanes est donnée par la différence *a-b*, rapportée à une courbe étalon, réalisée avec des anthocyanes libres de pellicules de raisins à maturité; ou plus simplement en multipliant par le coefficient 875: [A] mg/L = 875(*a-b*). Des exemples sont donnés pour différents échantillons *tableau VIII*. La méthode ne nécessite pas d'adaptation particulière pour les analyses de vins rosés.

Tableau VIII / Table VIII

Comparaison du dosage des anthocyanes par HPLC (anthocyanes-3-mG libres) et par décoloration au SO₂ (anthocyanes totales) sur des extraits de pellicules et différents vins (sauf indication contraire les résultats sont en mg/L)

Comparison of anthocyanin quantification by HPLC (anthocyanins-3-mG) and SO₂ discoloration (total anthocyanins) recorded on skins and wines (Without other information the results are expressed in mg/L)

Echantillons	Anthocyanes libres (HPLC) <i>a</i>	Anthocyanes totales (décol. SO ₂) <i>b</i>	Anthocyanes combinées ¹ (%) <i>c</i>	Différence <i>a, b</i> (%) <i>d</i>
<i>Extraits de pellicules</i>				
1 Cabernet sauvignon	345	468	tr. ²	26
2 Merlot noir	293	382	tr.	23
<i>Vins rouges jeunes</i>				
3 Fin FA	236	375	7	37
3' Fin FML	197	317	18	38
3" 1 an d'élevage	142	286	35	50
<i>Vins rouges</i>				
4 Médoc 2000	247	460	46	46
5 Saint-Emilion 2000	182	355	38	49
6 Saint-Emilion 2001	248	585	52	58
7 Macon 2000	42	168	47	75
8 Chili 2000	154	645	35	76
9 Rioja 1990	25	294	62	91
<i>Vins rosés</i>				
10 Provence 2001	24	37	12	35
11 Cialret Quinsac 2001	32	56	20	43

¹ Dosage avant et après adsorption sur colonne de PVPP d'une prise d'essai de vin et élution sélective des anthocyanes libres (Glories, 1976).

² Traces.

Dosage des anthocyanes libres par HPLC

La méthode chromatographique est comme pour les proanthocyanidols envisageable pour des dosages quantitatifs. Mais dans ce cas et à l'inverse des tanins, les structures des anthocyanes sont pratiquement connues et identifiées pour les *Vitis vinifera* communément vinifiés. A titre d'exemple, on peut observer un chromatogramme figure 7. Cependant, la méthode chromatographique n'est capable que de doser avec une bonne précision les anthocyanes sous formes libres (monoglucosides et acylées), écartant les formes combinées aux proanthocyanidols. Ces formes là sont pourtant importantes puisqu'il s'agit de la matière colorante stable, majoritaire après quelques mois d'élevage. De sorte que le dosage par HPLC des anthocyanes monoglucosides représentent de moins en moins les anthocyanes totales, à mesure que le vin vieillit et s'éloigne des vinifications (Tableau VIII).

Tableau VIII, nous avons regroupé un certain nombre d'analyses sur différents vins. On notera le décalage important pour les vins les plus âgés entre la valeur obtenue par HPLC et la méthode chimique par décoloration au SO₂. Il est préférable de choisir la méthode globale par décoloration au SO₂ pour le dosage des anthocyanes totales des vins.

* *
*

BIBLIOGRAPHIE

- BATE-SMITH (E.C.), 1954. - Astringency in foods. *Biochem. J.*, **58**, 122.
- CHAPON (L.), CHEMARDIN (M.), CHOLLOT (B.), 1965. - Pouvoir tannant des tannoides. *Proceedings of European Brewery Convention, Stockholm*, 372-383.
- CHAPON (L.), CHOLLOT (B.), URION (E.), 1961. - Etude physicochimique des associations entre protéines végétales et substances polyphénoliques. *Bull. Soc. Chim., Biol.*, **15**, 429-442.
- CHAPON (L.), LOUIS (C.), CHAPON (S.), 1971. - Estimation du pouvoir réducteur des bières par le complexe fer/dipyridyle. *Proceedings of European Brewery Convention, Estoril*, 307-322.
- GLORIES (Y.), 1976. - Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges. III- Fractionnement des composés phénoliques avec la polyvinylpyrrolidone. *Connaissance Vigne Vin*, **10**, 51-71.
- GOVINDARAJAN (V.S.), MATHEW (A.G.), 1965. - Anthocyanidins from leucoanthocyanidins. *Phytochemistry*, **4**, 985-988.
- MASQUELIER (J.), VITTE (G.), ORTEGA (M.), 1959. - Dosage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **98**, 145-148.
- MOUTOUNET (M.), 1981. - Dosage des polyphénols des moûts de raisin. *Conn. Vigne Vin*, **15**, 287-301.
- PORTER (L.J.), HRSTICH (L.N.), CHAN (B.G.), 1986. - The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, **25**, 223-230.
- PRIEUR (C.), RIGAUD (J.), CHEYNIER (V.), MOUTOUNET (M.), 1994. - Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **36**, 781-784.
- RIBERAU-GAYON (P.), 1970. - Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chim. anal.*, **2**, 627-631.
- RIBERAU-GAYON (P.), STONESTREET (E.), 1964. - La constitution des tanins du raisin et du vin. *CR Acad. Agric.*, 662-671.
- RIBERAU-GAYON (P.), STONESTREET (E.), 1965. - Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim. France*, **419**, 2649-2652.
- RIGAUD (J.), PEREZ-ILZARBE (J.), RICARDO DA SILVA (J.M.), CHEYNIER (V.), 1991. - Micro-method for the identification of proanthocyanidins using thiolysis monitored by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **540**, 401-405.
- SAINT CRICQ DE GAULEJAC (N.), FREITAS (V.), GLORIES (Y.), BOURGEOIS (G.), VIVAS (N.), 1998. - Fractionnement et dosage des procyanidines oligomères des raisins et des vins: Relation avec la qualité des vins. *Sci. Aliments*, **18**, 59-76.
- SARNI-MANCHADO (P.), DELERIS (A.), AVALLONE (S.), CHEYNIER (V.), MOUTOUNET (M.), 1999. - Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**, 81-86.
- SINGLETON (V.L.), 1974. - Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. *Adv. Chem. Series*, **137**, 184-211.
- SINGLETON (V.L.), ROSSI (J.A.), 1965. - Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic, phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-151.
- VIVAS (N.), GLORIES (Y.), LAGUNE (L.), SAUCIER (C.), AUGUSTIN (M.), 1994. - Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, 319-336.
- WULF (L.W.), NAGEL (C.W.), 1978. - High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**, 42-49.