

# ANALYSE DE GEOSMINE DANS LES VINS : APPORT DE LA MICROEXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPME) COUPLEE A L'ANALYSE PAR GC-MS

## Auteurs :

- Michel DUMOULIN (Laboratoire EXACT. 69, Rue Lacretelle – 71000 MACON. Tel : 03-85-20-93-25, fax : 03-85-20-93-26, e-mail : laboexact@wanadoo.fr)
- Jean-Michel RIBOULET (CEVAQOE. 12, Rue Clément Ader – 31170 TOURNEFEUILLE. Tel : 05-61-07-24-03, fax : 05-61-07-24-06, e-mail : CEVAQOE-RIBOULET@wanadoo.fr)

## RESUME :

Il est apparu récemment sur le marché des vins présentant une forte odeur de terre, cave, humus associés à la présence fréquente de géosmine. Nous avons mis au point, au sein de notre laboratoire, une méthode de détermination et de quantification de la géosmine dans les vins basée sur la micro extraction en phase solide (SPME) couplée à la spectrométrie de masse. L'étude des paramètres d'adsorption SPME et l'utilisation du mode MS/MS, nous a permis d'optimiser les conditions de dosage de la géosmine dans les vins. Notre méthode se caractérise par une linéarité entre 10 et 200 ng/litre, une limite de détection inférieure à 5 ng/litre et une répétabilité comprise entre 6 et 7%.

**MOTS CLES :** géosmine, vin, SPME, GC-MS.

## INTRODUCTION

Depuis peu il apparaît dans de nombreux vins de nos régions des déviations organoleptiques caractérisées par des sensations de type terreux, betteraves rouges, odeur de cave, humus,...Des analyses par olfactométrie couplées à la spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence dans la plupart de ces vins la présence de *trans*-1,10-diméthyl-*trans*-9-decalol, plus connu sous le nom de géosmine (1).

Des études menées pour identifier la flore présente sur les baies tendent à prouver que la géosmine aurait une origine microbienne. En effet, l'identification de la flore fongique sur les baies issues de sites particulièrement touchés par l'apparition de goûts terreux dans les vins, montre la présence presque systématique de souches de *Penicillium Expansum* en association avec des souches de *Botrytis Cinerea*. Le potentiel de production en géosmine de *Penicillium Expansum* a pu être démontré par développement des souches isolées sur baies mises en culture (2).

Les protocoles analytiques de détermination de la géosmine se sont surtout développés dans le domaine des eaux. En effet, c'est en 1965 que la géosmine est mise en évidence dans des eaux de consommation présentant des goûts de type « terreux » (3). La géosmine présente un seuil de perception dans l'eau compris entre 1 et 10 ng/litre et nécessite de ce fait des protocoles analytiques très performants. L'extraction de la géosmine a d'abord été réalisée par concentration sur des adsorbants du type charbon actif, dérivés de silice,...ou par partage liquide-liquide à l'hexane. Ces méthodes sont longues et nécessitent de nombreuses

opérations pouvant générer des pertes en géosmine et conduire ainsi à de nombreuses imprécisions sur les résultats.

Le développement de la micro extraction en phase solide (SPME) et l'utilisation en routine de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont permis de mettre au point des méthodes d'analyse de la géosmine dans l'eau plus fiables et plus rapides (4).

Nous présentons dans cet article nos résultats sur la mise au point d'une méthode d'analyse de la géosmine dans les vins reposant sur l'utilisation de la micro extraction en phase solide (SPME) couplée à la GC-MS (chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse). L'optimisation des conditions d'analyse par spectrométrie de masse est présentée, ainsi que l'étude de l'influence des paramètres d'adsorption en SPME.

## **MATERIELS ET METHODES**

### **Réactifs et standards analytiques**

L'eau de qualité HPLC, l'éthanol absolu, l'acide chlorhydrique à 37%, l'acide tartrique, le chlorure de sodium et l'hydroxyde de sodium sont fournis par VWR (Limonest, France). La (+/-) géosmine à 100 µg/ml dans le méthanol est fournie par SUPELCO (Saint Quentin Fallavier, France). La (+/-) géosmine-d5 (EI, étalon interne) (analogue de la géosmine où 5 atomes d'hydrogènes sont remplacés par 5 atomes de deutérium) est fournie par ULTRAFINE (Manchester, England).

### **Simulant vin**

Pour la mise au point de la méthode d'analyse, ainsi que pour sa validation, un mélange de simulant vin est préparé. Il est constitué par un mélange d'eau qualité HPLC contenant 12% d'éthanol absolu en volume et 2,5g/litre d'acide tartrique. Son pH est ajusté à 3,5 à l'aide d'une solution aqueuse de soude à 10 mol/litre.

### **Solutions étalons**

Des solutions de géosmine et géosmine d5 à 10µg/litre sont préparées par dilution des standards analytiques dans l'éthanol absolu.

### **Extraction SPME des échantillons de vin**

Dans les conditions optimisées, 5 ml de vin sont placés dans un vial en verre de 20 ml, saturés par 3g de chlorure de sodium et dilués à 50% dans de l'eau qualité HPLC préalablement acidifiée à pH = 3 par une solution d'acide chlorhydrique à 6 mol/litre. 100 ng/litre de géosmine d5 (EI) sont également ajoutés au mélange. Le vial est serti à l'aide d'une capsule magnétique.

L'adsorption SPME est réalisée sur l'espace de tête du mélange précédent. Elle est effectuée sur une fibre en polydiméthylsiloxane (PDMS) de 100µm d'épaisseur, à 40°C pendant 30 minutes et sous agitation.

### **Analyse chromatographique**

Après adsorption de l'espace de tête de l'échantillon de vin, les composés volatils sont désorbés pendant 10 minutes dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse 3900 VARIAN couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique 2100 VARIAN.

L'injection est réalisée en mode splitless à 260°C et la séparation des composés volatils est conduite sur une colonne capillaire VF5-MS (VARIAN) de dimensions : longueur 30 m, diamètre interne 0,25 mm, épaisseur de film 0,25 µm. La programmation de température du

four est la suivante : 50°C – 1 minute ; 8°/min jusqu'à 170°C ; 25°/min jusqu'à 280°C ; 280°C – 4,60 minutes.

L'analyse de la géosmine et de la géosmine d5 est effectuée en mode MS/MS par fragmentation sélective des ions 112 et 114 respectivement. La quantification est réalisée sur les ions fils 97 (géosmine) et 99 (géosmine d5).

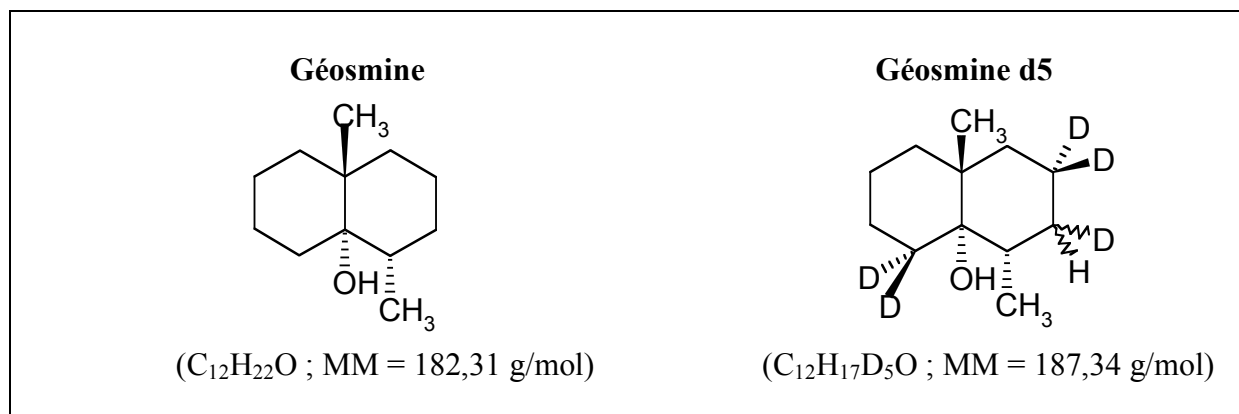
## RESULTATS ET DISCUSSION

### Optimisation des conditions d'analyse en spectrométrie de masse

Caractérisée par un seuil de perception extrêmement faible, la géosmine nécessite une technique d'extraction performante.

Le couplage de la SPME avec la GC-MS permet de répondre à cet objectif. En effet, la SPME permet d'atteindre des sensibilités  $10^3$  fois supérieures à la technique d'injection d'extrait liquide. De plus, le nombre limité de manipulation de l'échantillon (prélèvement de 5 ml de vin dans un vial) supprime tous les risques de perte en composés volatils, dont la géosmine.

Quant à la spectrométrie de masse, elle permet d'abaisser encore les limites de détection en analysant un ou plusieurs ions spécifiques en mode d'impact électronique classique ou en mode MS/MS.



*Figure n°1*

**Géosmine**

**Géosmine d5**

*Figure n°2 : Spectres de masse de la géosmine et de la géosmine d5*

Nous avons choisi dans cette étude de travailler en mode MS/MS résonnant, qui présente l'avantage de supprimer efficacement le bruit de fond apporté par la matrice et la présence de pic interférent. Ce mode consiste à sélectionner un ion (ion père) dans le spectre de masse du composé d'intérêt et à la fragmenter de nouveau pour obtenir un second spectre de masse, dans lequel est sélectionné un ion (ion fils) pour la quantification.

Le spectromètre de masse utilisé dans cette étude est une trappe ionique et l'optimisation des conditions MS/MS se fait sur le réglage de la tension aux bornes de l'analyseur. Dans le tableau n°1 sont reportés les conditions MS/MS retenues pour l'analyse de géosmine et géosmine d5.

**Tableau n°1 : Conditions optimales d'analyse MS/MS en mode résonnant de la géosmine et de la géosmine d5**

Analytes	Ion père (m/z)	Ion fils (m/z)
Géosmine	112	97
Géosmine d5	114	99

### **Influence de la durée d'adsorption SPME**

L'adsorption des composés volatils sur la fibre SPME est gouvernée par l'équilibre qui se produit entre la phase gazeuse de l'espace de tête de l'échantillon et la phase solide de la fibre adsorbante. Cet équilibre nécessite un temps suffisant qui dépend principalement de la température d'adsorption.

Afin d'évaluer l'influence de ce paramètre, nous avons mesuré l'évolution du rapport Signal/bruit de fond (S/B) au temps de rétention de la géosmine pour des adsorptions à 40°C de différentes durées sur un simulant vin supplémenté à 50 µg/litre en géosmine. Les résultats de ces essais sont reportés dans le tableau n°2.

**Tableau n°2 : Influence de la durée d'adsorption sur le rapport Signal/Bruit de fond (S/B) au temps de rétention de la géosmine. Adsorption à 40°C d'échantillon de simulant vin non dilués sur fibre PDMS 100µm. Analyse en mode EI-MS simple.**

<b>Durée (minutes)</b>	30	60	120
<b>S/B (géosmine)</b>	4810	5900	6100

Nous pouvons noter une évolution significative du rapport S/B entre 30 et 60 minutes indiquant que l'équilibre d'adsorption n'est pas complètement atteint. L'évolution est beaucoup plus faible au delà de 60 minutes. Il est probable que l'équilibre d'adsorption est atteint à partir de 60 minutes.

### **Influence du taux de dilution de l'échantillon**

La sensibilité de l'analyse par SPME dépend principalement de la quantité en composé d'intérêt adsorbé sur la fibre. Cette quantité est fonction de la teneur en composé à doser dans l'espace de tête. L'ajout de chlorure de sodium permet de réduire la solubilité des composés organiques dans des mélanges hydroalcooliques comme le vin. L'addition d'eau permet également, en réduisant la teneur en éthanol, de favoriser le passage des composés volatils de la phase liquide vers la phase gazeuse de l'échantillon. Cette dernière opération présente également l'avantage de limiter considérablement l'usure des fibres SPME, par rapport à des adsorptions sur des échantillons de vin non dilués.

Nous avons donc évalué sur un simulant supplémenté avec 50µg/litre de géosmine l'effet de la dilution par de l'eau de qualité HPLC acidifiée à pH=3 à l'aide d'acide chlorhydrique à 6 mol/litre. Les résultats sont reportés dans le tableau n°3.

**Tableau n°3 :** Influence du taux de dilution de l'échantillon sur le rapport S/B au temps de rétention de la géosmine. Adsorption à 40°C pendant 60 minutes sur fibre PDMS 100µm. Analyse en mode EI-MS simple.

<b>Taux de dilution</b>	Pur	1/2	1/3	1/5
<b>S/B (géosmine)</b>	5940	4920	4890	4450

Ces résultats permettent de constater que la dilution ne modifie pas considérablement le rapport S/B au temps de rétention de la géosmine. La diminution de S/B n'excède pas 25% alors que l'échantillon est dilué au 1/5<sup>ème</sup>. Ceci s'explique à la fois par une solubilité plus faible de la géosmine dans la phase liquide et par une diminution importante du bruit de fond. Le taux de dilution est intéressant car il est facile à mettre en œuvre et permet une durée d'utilisation plus importante de la fibre.

### **Influence de la température d'adsorption**

La température d'adsorption a également un impact sur les limites de détection. Les phénomènes d'adsorption et de vaporisation (passage de la phase liquide à la phase gazeuse) sont contrôlés par des équilibres dépendant directement de la température.

Afin d'évaluer si, dans le cas de la géosmine, la température pouvait avoir un effet bénéfique sur la sensibilité de la méthode, nous avons comparé une adsorption réalisée à 40°C et une adsorption réalisée à 50°C. Le tableau n°4 présente les résultats de ces deux essais réalisés sur du simulant vin dilué à 50% et supplémenté à 100 ng/litre de géosmine.

**Tableau n°4 :** Influence de la température d'adsorption sur le rapport S/B au temps de rétention de la géosmine. Adsorption à 40°C, 30 minutes sur fibre PDMS 100µm. Analyse en mode MS/MS optimisé.

<b>Température d'adsorption (°C)</b>	40	50
<b>S/B (géosmine)</b>	13800	13200

Nous pouvons constater que l'effet de la température est peu significatif dans les conditions d'analyse retenues pour la géosmine.

### **Choix des paramètres d'analyse et performances de la méthode**

L'objectif de cette étude était de mettre au point une méthode d'analyse de la géosmine dans les vins à la fois rapide, simple à mettre en œuvre et présentant une fiabilité en relation avec le seuil de perception de cette molécule dans les vins (40 à 60 ng/litre).

Les conditions opératoires que nous avons donc retenues sont les suivantes :

- Durée d'adsorption : 30 minutes
- Température d'adsorption : 40°C
- Taux de dilution de l'échantillon : 0,5
- Acquisition du signal en mode MS/MS sur les ions 97 et 99 pour la géosmine et la géosmine d5 respectivement.

La durée d'adsorption choisie ne permet pas d'atteindre l'équilibre, mais l'utilisation de géosmine d5 comme étalon interne permet de gommer les imprécisions résultant d'une adsorption incomplète.

Dans ces conditions, les performances de la méthode sont les suivantes :

- Limite de détection : 5 ng/litre
- Répétabilité sur 2 fois 5 mesures : 6,7% à 10 ng/litre et 6,1% à 100 ng/litre.
- Linéarité entre 10 et 200 ng/litre avec un facteur de corrélation  $R^2 = 0,999$ .

## **CONCLUSIONS**

Nous avons pu montrer dans cette étude les potentialités de la SPME couplée à la GC-MS pour l'analyse de géosmine dans les vins. La méthode que nous avons optimisée offre aux professionnels de la filière vin un outil de diagnostic rapide et fiable pour confirmer la qualité organoleptique de leur produits.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) –P.Darriet, M. Pons, S.Lamy, D.Dubourdieu. J.Agric.food Chem. 2000, 48, 4835-4838.
- (2) – S.La Guerche, D.Blancard, S.Chamont, D.Dubourdieu, P.Darriet. VII<sup>ème</sup> Symposium International d'œnologie. Bordeaux 19-21 Juin 2003.
- (3) – N.N.Gerber, H.A.Lechevalier. Appl. Microbiol. 1965, 34(6), 935.
- (4) – S.B.Watson, B.Brownlee, T.Satchwill, E.E.Hargesheimer. Water research : (Oxford). 2000, 34(10), 2818-2828.